



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

**Modelo de digestión gastrointestinal *In vitro* para la  
obtención de fracciones peptídicas antioxidantes y  
quelantes de metales a partir de las semillas de  
*Erythrina edulis***

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

Estela del Socorro SOLANO ABAD

**ASESOR**

Karim Lizeth JIMÉNEZ ALIAGA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Solano E. Modelo de digestión gastrointestinal *In vitro* para la obtención de fracciones peptídicas antioxidantes y quelantes de metales a partir de las semillas de *Erythrina edulis* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2017.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**“Modelo de digestión gastrointestinal In vitro para la obtención de fracciones peptídicas antioxidantes y quelantes de metales a partir de las semillas de Erythrina edulis”**

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

**ESTELA DEL SOCORRO SOLANO ABAD**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

*Dieci Nueve (19)*

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 01 de diciembre de 2017.

Mg. César Máximo Fuertes Ruitón  
Presidente

Dr. Víctor Luis Izaguirre Pasquel  
Miembro

Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar  
Miembro

Mg. Cynthia Giovanna Esquerre Huallpa  
Miembro

**“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”**

## DEDICATORIA

**A mis amados padres,** Rosa y Martín, por su amor, confianza y apoyo incondicional esto es por ustedes y para ustedes.

**A mis hermanos,** José Martín, Carlos David, Dina Elisa, Daniel Esaú, que siempre me brindaron sus mejores deseos.

**A mis tíos,** Socorro, Tomasa, Arnaldo, que me brindaron apoyo cuando más lo necesitaba.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**, mi valiosa casa de estudios y a la **Escuela de Farmacia y Bioquímica** que nos orienta y forma profesionalmente en la carrera de Farmacia.

A mi asesora de tesis, **Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga**, por brindarme siempre su confianza y apoyo como asesora, amiga y madre para lograr esta meta.

A la **Dra. Amparo Zavaleta Pesantes**, por siempre impulsarnos a la investigación y por la confianza depositada y permitir mi ingreso al laboratorio de Biología Molecular.

A la **Mg. Inés Arnao Salas**, por sus conocimientos en la investigación y el apoyo en la realización de esta tesis.

Al **Lic. Arturo Intiquilla**, por su infinita paciencia y por siempre apoyarme y su confianza en mi trabajo y no olvidar su dichosa frase “Todo esfuerzo tiene su recompensa”.

A una persona especial **Luis Benito** por brindarme el apoyo en terminar lo que empecé y siempre valorar todo el esfuerzo que uno realiza.

A equipo de Laboratorio de Biología Molecular (Naty, Stefy, Carlos, Karen, Sayuri, Johana, José Manuel, “My Friend”), por su amistad y el apoyo en el transcurso del desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de mi promoción ingresante 2011 (Rebeca, Juan Pablo, Paolita, Eder, Wesly, Giancarlos, Irvin), gracias por su infinita amistad y por sus buenos deseos.

A los docentes miembros del Jurado Examinador y Calificador por las sugerencias en la revisión de este trabajo de investigación.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Este trabajo fue financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad Innóvate Perú, Contrato 186-FINCyT-IA-2013 y parcialmente por el Fondo de Promoción de trabajo de Tesis de Pregrado del VRI-UNMSM (Código N° 150403121).

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
Objetivos.....	14
<b>I. ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
1. Estrés Oxidativo.....	17
Enfermedades asociadas al estrés oxidativo.....	18
2. Péptidos bioactivos.....	21
Definición.....	21
Fuentes de obtención de péptidos bioactivos.....	21
Actividades biológicas.....	21
- Actividad antihipertensiva.....	22
- Actividad antimicrobiana.....	24
- Actividad antioxidante.....	25
- Actividad quelante de metales.....	27
3. Métodos para la determinación de la actividad antioxidante.....	28
- Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno.....	28
- Determinación de la capacidad captadora de radical ABTS+.....	29
- Determinación de la actividad quelante de metales.....	30
Actividad quelante de Cobre.....	30
Actividad quelante de Hierro.....	31
4. Alternativas tecnológicas para la obtención de péptidos bioactivos.....	31
- Hidrólisis enzimática.....	32



-	Modelo de digestión gastrointestinal.....	32
-	Hidrólisis con enzimas de origen microbiano.....	34
5.	<i>Erythrina edulis</i> (pajuro) fuente potencial de péptidos bioactivos.....	35
-	Taxonomía.....	36
-	Etimología y nombres comunes.....	36
-	Descripción .....	37
-	Distribución en el Perú.....	38
-	Aportes del pajuro.....	39
-	Fracciones proteicas presentes en el pajuro.....	39
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
1.	Obtención de la harina de las semillas de <i>Erythrina edulis</i> .....	41
2.	Análisis proximal de la harina de <i>Erythrina edulis</i> .....	41
3.	Fraccionamiento proteico de la harina de <i>Erythrina edulis</i> .....	41
4.	Cuantificación de proteínas.....	43
	Cuantificación por el método de Bradford.....	43
	Cuantificación por el método de BCA.....	44
5.	Electroforesis (SDS-PAGE).....	44
6.	Obtención de fracciones peptídicas .....	46
	a. Hidrólisis de las proteínas de pajuro utilizando el modelo de digestión gastrointestinal .....	46
	b. Hidrólisis secuencial con la enzima alcalasa.....	47
	c. Grado de hidrólisis (GH).....	48
7.	Determinación de actividad antioxidante.....	50
	a. Método de ORAC.....	50
	b. Método de ABTS.....	52
8.	Actividad quelante de metales.....	53
	a. Capacidad quelante de $\text{Cu}^{+2}$ .....	54
	b. Capacidad quelante de $\text{Fe}^{+2}$ .....	55
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>VI.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABTS:** Radical (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico).

**BCA:** Ácido bicinconínico.

**BSA:** Estándar albúmina de suero bovino.

**CP:** Concentrado proteico.

**DPIV:** Digestibilidad proteica *In Vitro*.

**E/S:** Enzima/Sustrato.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**EROs:** Especies reactivas de oxígeno.

**FL:** Fluoresceína.

**GH:** Grado de hidrólisis.

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria 50.

**OPA:** Ortoftaldialdehído.

**ORAC:** Capacidad de absorción de radical oxígeno.

**PV:** Pirocatecol violeta.

**ROO·:** Radical peróxilo.

**SDS:** Dodecilsulfato de sodio.

**TEAC:** Capacidad antioxidante equivalente al Trólox.

**TEMED:** Tetrametiletilendiamina.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. ....	19
<b>Tabla 2.</b> Péptidos bioactivos y sus actividades en el organismo .....	22
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de aminoácidos con actividad antioxidante .....	27
<b>Tabla 4.</b> Obtención de péptidos mediante hidrólisis enzimática.....	32
<b>Tabla 5.</b> Clasificación taxonómica del pajuro .....	36
<b>Tabla 6.</b> Preparación de la curva de Trólox . ....	51
<b>Tabla 7.</b> Análisis proximal de la harina de pajuro.....	56
<b>Tabla 8.</b> Concentración de proteínas por el método de Bradford y porcentaje de digestibilidad <i>In Vitro</i> (DPIV) tras la hidrólisis con pepsina (HP), pancreatina (HPP) y alcalasa (HPPA). ....	59
<b>Tabla 9.</b> Resumen de la actividad antioxidante.....	63
<b>Tabla 10.</b> Actividad antioxidante mediante el método ABTS expresada IC <sub>50</sub> .....	65
<b>Tabla 11.</b> Actividad quelante de cobre y hierro de hidrolizados proteicos de albúmina, globulina y glutelina, con las enzimas pepsina, pancreatina y alcalasa.....	67

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Generación de EROs a partir de la reducción de oxígeno .....	17
<b>Figura 2.</b> Relación de las causas que desencadenan un incremento del estrés oxidativo y las enfermedades asociadas .....	18
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de la Enzima Convertidora de Angiotensina-I .....	23
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos .....	24
<b>Figura 5.</b> Ataque de los radicales libres a la célula .....	25
<b>Figura 6.</b> Interacción de las especies reactivas de oxígeno con los antioxidantes naturales .....	26
<b>Figura 7.</b> Formación del Quelato .....	28
<b>Figura 8.</b> Representación de la pérdida de fluorescencia cuando actúa el radical peroxil .....	29
<b>Figura 9.</b> Estructura de ABTS <sup>•+</sup> en la reacción con el antioxidante .....	30
<b>Figura 10.</b> Estructura de pirocatecol violeta .....	30
<b>Figura 11.</b> Reacción de Fenton .....	31
<b>Figura 12.</b> Estructura de la ferrozina .....	31
<b>Figura 13.</b> Digestión gastrointestinal <i>In Vitro</i> .....	33
<b>Figura 14.</b> Semillas de pajuro .....	35
<b>Figura 15.</b> Distribución geográfica y nombres según cada país .....	37
<b>Figura 16.</b> Árbol de <i>Erythrina edulis</i> (pajuro) .....	38
<b>Figura 17.</b> Metodología para la obtención fracciones peptídicas y evaluación de la actividad antioxidante y quelante de metales a partir de semillas de <i>Erythrina edulis</i> . ....	40
<b>Figura 18.</b> Metodología del fraccionamiento proteico a partir de la harina de pajuro .....	42
<b>Figura 19.</b> Fundamento del método del ácido bicinconínico (BCA) .....	44
<b>Figura 20.</b> Método de digestibilidad proteica .....	47
<b>Figura 21.</b> Mecanismo de acción del método de ORAC .....	50
<b>Figura 22.</b> Mecanismo de acción del método de ABTS .....	52
<b>Figura 23.</b> Formación del complejo quelante de cobre .....	54
<b>Figura 24.</b> Formación del complejo quelante de hierro .....	55
<b>Figura 25.</b> Rendimiento de cada fracción a partir de 100 g. ....	57
<b>Figura 26.</b> Perfil electroforético de las fracciones proteicas de pajuro donde: 1 albúmina; 2 globulina; 3 prolamina; 4 glutelina y 5 concentrado proteico total. ....	58

## RESUMEN

**Introducción.** Las proteínas vegetales son una alternativa a las de origen animal porque además de poseer múltiples beneficios nutricionales constituyen una fuente de péptidos bioactivos. *Erythrina edulis* (pajuro) es una leguminosa subutilizada oriunda de Suramérica que presenta un alto contenido de proteínas (hasta 25%) que son una fuente potencial de hidrolizados y péptidos con propiedades biológicas. **El objetivo** fue obtener fracciones peptídicas con actividad antioxidante y quelante de metales a partir de las semillas de *Erythrina edulis* utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *In Vitro*. **Metodología.** Las fracciones proteicas se obtuvieron a partir de la harina de las semillas de pajuro. La hidrólisis proteica de cada fracción se realizó utilizando el modelo de digestión gastrointestinal utilizando las enzimas digestivas pepsina 0.7 FIP (HP) y pancreatina 350 FIP- U/g (HPP) a una proporción enzima-sustrato 1/50 p/p adicionalmente se utilizó la enzima alcalasa 2.4 U/g proteína (HPPA). La capacidad antioxidante se determinó mediante el método de neutralización de radicales de oxígeno (ORAC-FL). Además, se determinó la actividad quelante de hierro y cobre. **Resultados.** Se obtuvieron cuatro fracciones proteicas, siendo en función de abundancia las siguientes: albúmina, glutelina, globulina y prolamina, cada una de las fracciones mostró un perfil electroforético diferente. Los hidrolizados obtenidos después de la actividad de las tres enzimas sobre las albúminas y globulinas fueron las que presentaron una mayor actividad antioxidante, con valores de ORAC-FL de  $4957.2 \pm 35.1$  y  $5177.2 \pm 23.0$   $\mu\text{mol}$  de equivalente de Trólox (ET)/mg de proteína, respectivamente. Además ambos hidrolizados mostraron más del 50% de capacidad quelante de hierro a la concentración de 360  $\mu\text{g/mL}$ . En el caso de la actividad quelante de cobre, los hidrolizados obtenidos con las tres fracciones proteicas mostraron porcentajes superiores al 70% de quelación a 180  $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusiones.** Las albúminas y globulinas del pajuro presentan un importante potencial como fuente de péptidos antioxidantes y quelante de metales después del modelo de digestión gastrointestinal con enzimas digestivas y alcalasa.

## ABSTRACT

**Introduction.** Vegetable proteins are an alternative to animal proteins because these have a great number of nutritional benefits, in addition they are a source of bioactive peptides. *Erythrina edulis* (pajuro) is a no valorized native legume from South America that has a high content of proteins (up to 25%) that are a potential source of hydrolysates and peptides with biological properties. The objective was obtaining peptide fractions with antioxidant and metal chelating activities from *Erythrina edulis* seeds, using an *in Vitro* gastrointestinal digestion model. **Methodology.** Protein fractions were obtained from pajuro's seeds flour. Protein hydrolysis of each fraction was carried out with the gastrointestinal digestion model using digestive enzymes such as pepsin 0.7 FIP (HP) and pancreatin 350 FIP-U/g (HPP) and an enzyme-substrate ratio 1/50 p/p. Additionally, alkaline enzyme alcalase 2.4 U/g protein (HPPA) was used for the final hydrolysis. The antioxidant capacity was determined by the oxygen radical neutralization method (ORAC-FL). Moreover, the chelating activity of iron and copper was determined. **Results** Four protein fractions were obtained, being in function of abundance the following: albumin, glutelin, globulin and prolamin, each of those showed a different electrophoretic profile. The hydrolysates obtained after the action of the three enzymes on the albumins and globulins were those that presented a higher antioxidant activity, with ORAC-FL values of  $4957.2 \pm 35.1$  y  $5177.2 \pm 23.0$   $\mu\text{mol}$  of Trolox equivalent (ET) /mg of protein, respectively. In addition, both hydrolysates showed more than 50 % iron chelating capacity at the concentration of 360  $\mu\text{g/mL}$ . In the case of the copper chelating activity, the hydrolysates obtained with the three protein fractions showed percentages higher than 70% chelation at 180  $\mu\text{g/mL}$ . **Conclusions.** The albumins and globulins of the pajuro present an important potential as a source of antioxidant and metal chelating peptides after the model of gastrointestinal digestion with digestive enzymes and alcalase.

## INTRODUCCIÓN

El aumento de la esperanza de vida de la población está ligado a enfermedades crónicas degenerativas y déficits funcionales de larga duración que demandan costosos servicios sanitarios y asistenciales. El estrés oxidativo (EO) ha sido relacionado con varias enfermedades, tales como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades oculares, lupus, etc.; posiblemente muchas de estas enfermedades se podrían prevenir o ralentizar con el uso apropiado de antioxidantes (1).

En este contexto, los péptidos bioactivos constituyen modelos de agentes terapéuticos interesantes, ya que se han reportado diversos péptidos con actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiapoptótica, etc. En este sentido las proteínas alimentarias se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional, sino como insumos para la obtención de péptidos funcionales o bioactivos, los cuales se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas después de su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (2)(3).

En los últimos años se vienen reportando péptidos bioactivos provenientes de hidrolizados de proteínas de leguminosas con un buen perfil antioxidante y quelante de metales a partir de semillas de pallar (*Phaseolus lunatus*), frijol castilla (*Vigna unguiculata*), lentejas (*Lens culinaris*) (4) (5) (6).

En este contexto, las leguminosas constituyen fuentes potenciales de péptidos bioactivos por el alto contenido de proteínas que presentan sus semillas. *Erythrina edulis* es una leguminosa comúnmente conocida como “pajuro” “frejol gigante del Perú”, “poroto”, que crece en los valles interandinos y en la selva del Perú, no estando su cultivo aún tecnificado. Sus semillas se utilizan en la alimentación humana por su alto contenido de proteínas (aproximadamente 21%) tienen fácil digestión y la tradición oral aduce propiedades antienviejimiento (7) (8). Sin embargo, su consumo se limita a nivel local por los campesinos y la mayor proporción se subutiliza como alimentos de animales.

Por ende las semillas de pajuro constituyen una fuente importante de proteínas de alto valor que se podrían utilizar como sustrato para la obtención de péptidos bioactivos antioxidantes y/o quelantes de metales. Se ha establecido que los péptidos activos fisiológicamente, se producen a partir de proteínas alimentarias durante la digestión gastrointestinal y la fermentación con bacterias ácido lácticas.

En el presente trabajo se propone la obtención de fracciones peptídicas con actividad antioxidante y/o quelante de metales a partir de semillas de *Erythrina edulis* (pajuro) utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *In Vitro*. Y este contexto aportar nuevos ingredientes con potencial nutracéutico para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

A continuación se señala los objetivos planteados:

### **OBJETIVO GENERAL**

Obtener fracciones peptídicas con actividad antioxidante y quelante de metales a partir de semillas de *Erythrina edulis* utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *In Vitro* fracciones peptídicas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener fracciones proteínicas a partir de las semillas de *Erythrina edulis* (pajuro).
2. Caracterizar electroforéticamente las fracciones obtenidas.
3. Hidrolizar cada una de las fracciones utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *In Vitro*.
4. Evaluar la actividad antioxidante y quelante de metales de las fracciones obtenidas.



## I. ANTECEDENTES

En los últimos años se ha reportado diferentes estudios sobre la obtención de péptidos bioactivos con actividad antioxidante y quelante de metales a partir de semillas de leguminosas utilizando el modelo de digestión gastrointestinal *In Vitro* y de forma secuencial alguna proteasa adicional para mejorar la producción de péptidos bioactivos. A continuación pasaré a describir algunos trabajos:

Oseguera (2009) obtuvo hidrolizados proteicos con alta capacidad antioxidante, a partir de semillas de *Phaseolus vulgaris* L., de las variedades negro 8025 y Pinto Durango, mediante digestión gastrointestinal *In Vitro* y alcalasa de forma independiente. En ambas variedades evidenciaron buena capacidad captadora de radicales oxígeno en mmol equivalente al Trólox/mg de proteína, a los tiempos de hidrólisis de 80 min para la digestión gastrointestinal simulada y 120 min para alcalasa (9).

Borja (2014) obtuvo hidrolizados proteicos con buen perfil antioxidante a partir de *Lupinus mutabilis* ("tarwi") a través de la hidrólisis proteica con alcalasa y el crudo enzimático de *Bacillus* sp. evidenciando que los péptidos hidrolizados con alcalasa presentaron mayor actividad antioxidante en comparación al crudo enzimático (10).

Mojica y col. (2014) reportaron la presencia de péptidos antioxidantes YAGGS y YAAGS con buena capacidad neutralizadora de radicales oxígeno mediante el método ORAC, a partir del hidrolizado proteico de *Phaseolus vulgaris* crudo y precocinado, respectivamente. Los concentrados proteicos en cada caso se hidrolizaron con pepsina y pancreatina de forma secuencial (11).

Torres-Fuentes y col. (2015) hidrolizaron las proteínas de las semillas de *Cicer arietinum* ("garbanzo") mediante el modelo de digestión gastrointestinal *In Vitro*, y lograron identificar los péptidos antioxidantes ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH y SAEHGSLH, resaltando la presencia de los aminoácidos histidina, triptófano y fenilalanina que serían responsables de la capacidad antioxidante (12).

Uraipong (2016) reportó actividad antioxidante, antihipertensiva y antidiabética en fracciones peptídicas del salvado de arroz. Previamente realizó el fraccionamiento

de las proteínas albúmina, globulina, prolamina y glutelina. Las proteínas purificadas fueron hidrolizadas utilizando el modelo de digestión gastrointestinal *In Vitro*, alcalasa, protamex, neutrasa y flavorzima, de forma independiente. Los hidrolizados obtenidos fueron fraccionados con membranas de diferente corte molecular, destacando el mejor perfil antioxidante de la fracción peptídica hidrolizada con alcalasa de tamaño menor 3 kDa (13).

Orsini y col. (2016) reportó péptidos con actividad antioxidante a partir de las proteínas solubles de *Amaranthus mantegazzianus*, mediante digestión gastrointestinal *In Vitro*, las fracciones obtenidas fueron evaluadas por el método captador de radicales de oxígeno (ORAC). Identificando los péptidos AWEEREQGSR, YLAGKPQQEH, IYIEQGNGITGM y TEVWDSNEQ, en todos los casos resaltan la presencia de aminoácidos aromáticos (14).

Drummond y col. (2016) obtuvieron hidrolizados proteicos de *Linum usitatissimum* ("linaza") con la enzima alcalasa, lograron identificar la secuencia GFPGRLDHWCASE con mejor actividad antioxidante que presentó 3.20 mmol equivalente a Trólox/mmol de péptido, mediante el método ORAC (15).

En base a los antecedentes descritos decidimos utilizar el modelo de digestión gastrointestinal y la enzima alcalasa de forma secuencial como estrategia para la obtención de fracciones peptídicas con actividad antioxidante y quelante de metales a partir de las semillas de *Erythrina edulis*, una leguminosa subutilizada que constituye una fuente potencial de péptidos bioactivos por el alto contenido de proteínas que presenta sus semillas.

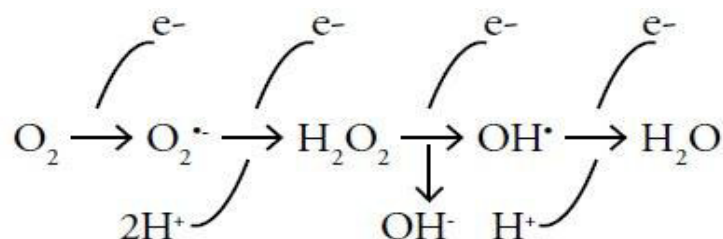
## II. MARCO TEÓRICO

### 1. Estrés Oxidativo

Nuestro organismo requiere de oxígeno para poder generar energía a través de la fosforilación oxidativa que se da en la mitocondria, sin embargo, este proceso libera EROs (Especies Reactivas de Oxígeno), por tanto, la vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensa contra las EROs, por un lado, que tiendan a impedir su formación y, por otro los neutralicen una vez formados. Los seres vivos poseen un conjunto de sistemas fisiológicos que se encargan de eliminar estas especies reactivas, ocupándose de mantener el estado de equilibrio que existe entre sustancias oxidantes y antioxidantes. Estos sistemas comienzan por reducir el oxígeno y son los llamados antioxidantes (16).

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo. La salud del organismo depende en gran medida de sistemas de defensas antioxidantes que actúan frente al daño producido por especies radicalarias (17)(18).

En condiciones fisiológicas la concentración de antioxidantes es superior a la concentración de EROs. A pesar de esto, la formación de EROs tiene lugar de forma continua pero controlada. El problema para nuestra salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos principalmente por contaminantes externos que penetran en nuestro organismo, desencadenando la aparición de diferentes enfermedades (17)

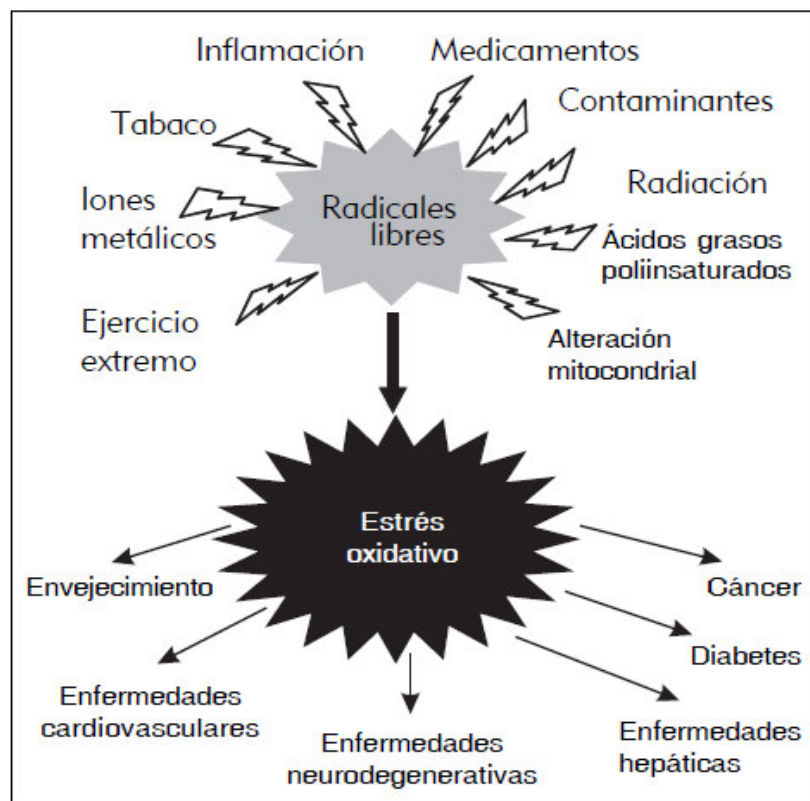


**Figura 1.** Generación de EROs a partir de la reducción de oxígeno (17).

Un ejemplo de la aparición de EROs es durante la fosforilación oxidativa, donde, el  $O_2$  se reduce hasta  $H_2O$  tras aceptar cuatro electrones en la cadena respiratoria en la mitocondria. Sin embargo, el 2% de oxígeno consumido es reducido de forma incompleta al aceptar un menor número de electrones, generando especies EROs como el radical  $OH\cdot$  (Figura 1) (18).

### Enfermedades asociadas al estrés oxidativo

El estrés oxidativo ha sido relacionado con varias enfermedades, tales como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades oculares, lupus, etc. Por tanto el estrés oxidativo prolongado tendría un impacto importante sobre la morbilidad y mortalidad de la población, el incremento del estrés oxidativo se agudiza por la exposición a agentes tóxicos externos, tales como tabaco, iones metálicos, contaminantes, radiación, etc. (figura 2) (20).



**Figura 2.** Relación de las causas que desencadenan un incremento del estrés oxidativo y las enfermedades asociadas (20).

En la Tabla 1 se describe la asociación de diferentes patologías con el estrés oxidativo:

Tabla 1. Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Enfermedades	Estudios
<b>Envejecimiento</b>	El efecto acumulativo de los cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren en un organismo vivo a través del tiempo, en respuesta a la interacción de factores genéticos y ambientales. La teoría de los radicales libres en el envejecimiento propone que este proceso resulta de la acumulación de lesiones orgánicas y exposición crónica a radicales libres. También se ha identificado una menor actividad de antioxidantes, inactivación de enzimas antioxidantes, acumulación de proteínas oxidadas e incremento en la tasa de producción de $H_2O_2$ y $O_2^{\cdot-}$ en comparación de células jóvenes (19)(20).
<b>Enfermedad de Alzheimer (EA)</b>	Se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas asociada con la agregación de placas de la proteína $\beta$ -amiloide y marañas de neurofibrilares de la proteína de unión a microtúbulos Tau. Una de las hipótesis actuales con respecto a la patogénesis de la EA está relacionada con la mitocondria y el EO. En un estudio realizado en cerebro y líquido cefalorraquídeo de sujetos con EA, comparado con sujetos de avanzada edad y controles jóvenes, se mostró que tanto el grupo con EA y los de avanzada edad presentaron aumento en los niveles de EROs, marcadores de oxidación de proteínas y disminución en el actividad de la glutamina sintetasa (21).
<b>Enfermedad de Parkinson (EP)</b>	Se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia <i>nigra</i> y agregación de la proteína $\alpha$ -sinucleína. Además del envejecimiento, el estrés oxidativo está implicado en la pérdida de células <i>nigro</i> -estriadas y defectos de la cadena respiratoria (22). También, en modelos animales <i>In Vitro</i> se ha identificado un aumento en los niveles de peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y ADN en comparación con el grupo control (21). Sin embargo, en un modelo <i>In Vitro</i> de células gliales consideradas como sitio de neurodegeneración en la EP, se ha identificado el proceso de muerte

	celular vía ERO y citoquinas proinflamatorias (22).
<b>Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)</b>	Se ha identificado que la inhibición de la superóxido dismutasa (SOD) repercute en la muerte de neuronas motoras y cordón espinal, lo cual puede ser inhibido con la suplementación de N-acetilcisteína, poniendo en manifiesto la participación de las EROs. Se ha observado esporádicamente en pacientes con ELA concentraciones normales de SOD, sin embargo en tejidos post-mórtem se han encontrado altas concentraciones de proteínas oxidadas, lo cual sugiere que otros mediadores de EROs y EO podrían estar implicados (23).
<b>Carcinogénesis</b>	Es un proceso caracterizado por el crecimiento incontrolado de células cancerosas, neuro-vascularización, entre otros fenómenos activados por diversos oncogenes. Estudios experimentales han reportado los posibles mecanismos implicados en la transformación maligna inducida por radicales libres, observando que la deficiencia de enzimas antioxidantes desencadena alteraciones características de la transformación celular (24). Relacionado a esto, se ha identificado que las EROs se asocian en el proceso de iniciación y el mantenimiento del fenotipo tumoral, donde $H_2O_2$ estimula la proliferación, migración y adhesión de estas células (25).
<b>Enfermedad cardiovascular</b>	En esta enfermedad participa el $NO\cdot$ como agente vasodilatador y el radical $O_2\cdot$ como oxidante de lipoproteínas LDL favoreciendo la aterogénesis (26). La participación del EO se da a través de la exposición a xenobióticos y condiciones fisiopatológicas que afectan al sistema cardiocirculatorio (25).
<b>Diabetes mellitus</b>	En esta enfermedad, la glucosa elevada altera la función de las proteínas, que junto con la autooxidación de los azúcares se generan EROs, por la disminución de la hemoxigenasa-1 que afecta a las células- $\beta$ del páncreas, promoviendo así el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad (27). Por otra parte, la vía del sorbitol es otro mecanismo que alterará la función y estructura de las células, a través de la disminución de NADPH y GSH, favoreciendo el establecimiento del EO (28).

## 2. Péptidos bioactivos

### Definición

Estos péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación, mediante hidrólisis química o enzimática (29). Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud, que son liberados durante el procesado industrial de los alimentos, o bien durante la digestión gastrointestinal. Tras la administración oral, los péptidos bioactivos pueden ejercer su efecto, entre otros, sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso. La literatura científica evidencia que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (3) (30).

### Fuentes de obtención de péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos han sido encontrados principalmente en las proteínas de la leche y en derivados de esta como quesos o yogurts. Pero también se ha observado su existencia en otras proteínas animales, pescados y diversos vegetales como soja, arroz o garbanzo e incluso hongos (31) (32).

Sin embargo las proteínas vegetales son una alternativa para la obtención de péptidos debido a su mayor disponibilidad y menor costo, como es el caso de leguminosas (33) (34).

### Actividades biológicas

En los organismos vivos, los péptidos endógenos pueden actuar como hormonas y neurotransmisores, jugando un papel muy importante en diferentes mecanismos fisiológicos. Esto es por su interacción con los receptores de las hormonas y las cascadas de señales, es como actúan sobre la regularización del metabolismo,

controlando la excreción en glándulas, ajustando la presión arterial en impactando en el factor de crecimiento (35).

**Tabla 2.** Péptidos bioactivos y sus actividades en el organismo (36).

Péptidos	Efectos en el Organismo
<b>Opioides</b>	Regulan el tránsito intestinal, mejoran la digestión y absorción.
<b>Inmunomoduladores</b>	Estimulan la respuesta inmune.
<b>Inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina I</b>	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.
<b>Antioxidantes</b>	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento.
<b>Quelantes</b>	Mejoran a la absorción de minerales y metales.
<b>Reguladores de la proliferación celular</b>	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos.
<b>Antimicrobianos</b>	Reducen el riesgo de infecciones.
<b>Antitrombóticos</b>	Reducen el riesgo de padecer de trombos.
<b>Hipocolesterolémicos</b>	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

A continuación, describiremos algunas de las actividades biológicas mencionadas anteriormente.

#### - **Actividad antihipertensiva**

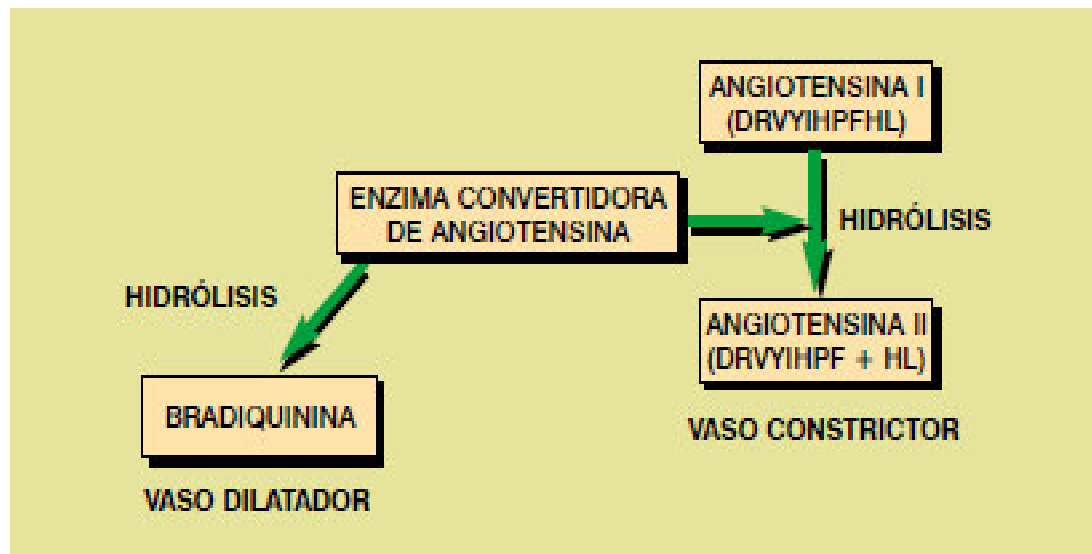
La función más conocida y extendida de los péptidos bioactivos aislados hasta ahora es la de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima es una Zn-metalopeptidasa que se expresa como un ectoenzima unida a la membrana de células endoteliales, fundamentalmente del sistema vascular. Por un lado, actúa incrementando la presión sanguínea al hidrolizar el decapeptido angiotensina I en el octapéptido vasoconstrictor angiotensina II. Por otro también degrada el péptido bradiquinina que es un potente vasodilatador (Figura 3). Esta



peptidasa se encuentra localizada en múltiples zonas del organismo, como pulmón, riñón, corazón, músculos, páncreas, cerebro, arterias, útero e intestino (37).

Los péptidos inhibidores de ECA son de pequeño tamaño, muchos di y tripéptidos, que son absorbidos fácil y rápidamente en el estómago e intestino. Pueden entrar en el sistema circulatorio e inhibir esta peptidasa, lo cual genera un descenso de la presión arterial. En este sentido, ya que la hipertensión está relacionada directamente con las enfermedades coronarias estos péptidos van a reducir los riesgos de generación de este tipo de enfermedades. Así, se han realizado ensayos de inhibición *In Vitro* de la ECA, pero también *In Vivo*, donde se ha observado que ratas hipertensas ven reducidas su presión arterial tras la ingesta de péptidos inhibidores de ECA demostrándose de esta forma el carácter beneficioso de su ingesta (37).

Péptidos inhibidores de ECA fueron aislados por primera vez en 1979 de un hidrolizado de gelatina obtenido con colagenasa. Desde entonces han sido encontrados en proteínas de leche fundamentalmente, y conocidos como casoquininas. Aunque también se han descrito en proteínas de pescado, maíz, trigo o arroz (37).



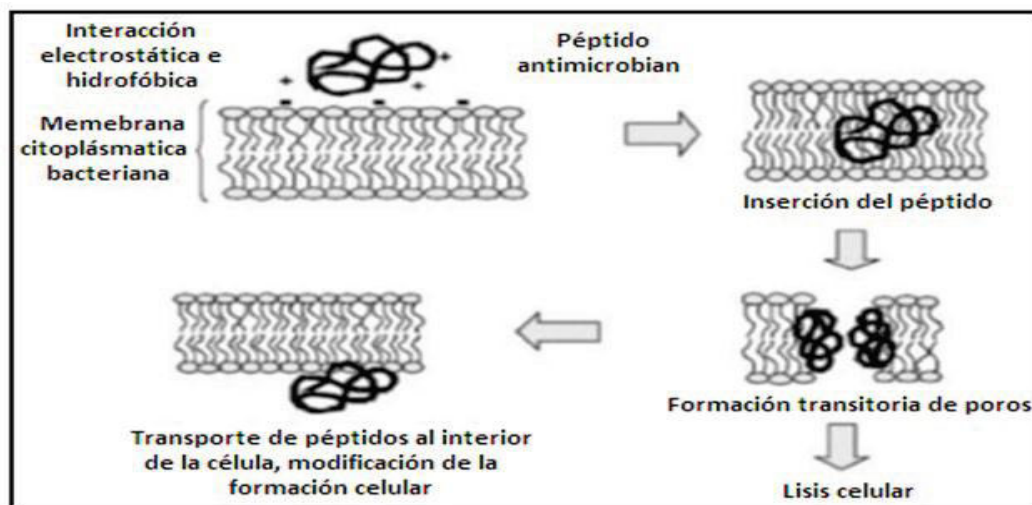
**Figura 3.** Mecanismo de acción de la Enzima Convertidora de Angiotensina-I (37).

### - Actividad antimicrobiana

Los péptidos bioactivos con actividad biológica tienen la capacidad de ejercer efectos específicos a nivel fisiológico en el organismo, como por ejemplo aquellos que presentan actividad antimicrobiana. Estas secuencias aminoacídicas son moléculas efectoras claves de la inmunidad innata, con tamaños que oscilan entre 2 a 200 aminoácidos. Diversos estudios han reportado que mediante la hidrólisis controlada *In Vitro* de proteínas alimentarias es posible generar este tipo de péptidos. Se han aislado péptidos antimicrobianos principalmente a partir de hidrolizados enzimáticos limitados, de proteína de origen animal como la leche, huevo y en algunas especies marinas (38) (39).

Sin embargo también han aislado hidrolizados limitados menor a 10% de grado de hidrólisis de proteínas de origen vegetal como la soya y el maíz (40). Los péptidos inhiben el crecimiento bacteriano y fúngico ya que actúan frente a diferentes bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y hongos filamentosos. El amplio uso de estos se debe a que poseen toxicidad selectiva que permite atacar de manera efectiva las células blanco mediante mecanismos que, al parecer, dificultan la aparición de resistencia (41).

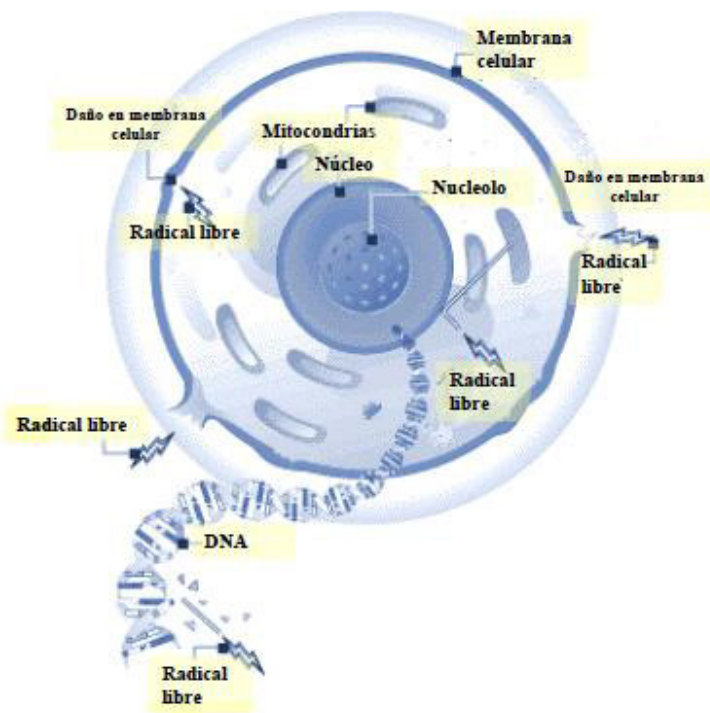
En la siguiente figura se observa el mecanismo de acción de los péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana contra los microorganismos.



**Figura 4.** Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos (41).

### - Actividad antioxidante

Las EROs, se generan constantemente en los organismos aeróbicos como resultado de las reacciones metabólicas (42). Una excesiva producción de EROs puede sobrepasar la capacidad antioxidante fisiológica. Como consecuencia de este daño oxidativo, las proteínas, los lípidos y ADN se convierten en el blanco del ataque de los radicales libres, dañando enzimas, membranas celulares y el material genético (figura 5) (43).



**Figura 5.** Ataque de los radicales libres a la célula (44).

Este daño ha sido relacionado con diversas enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide y sobre todo con el envejecimiento celular (45). Esto ha generado una serie de investigaciones dirigidas a la obtención de péptidos bioactivos con capacidad antioxidante que catalizan las reacciones de los radicales libres (46).

En este contexto los péptidos antioxidantes presentan cierta ventaja frente a otros antioxidantes debido a que su estructura simple les confiera cierta



**Tabla 3.** Secuencias de aminoácidos con actividad antioxidante (48).

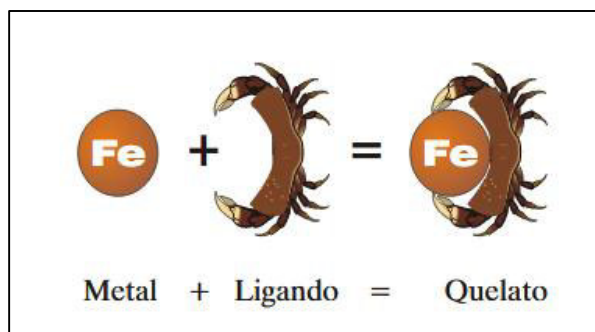
Fuentes de péptidos	Secuencias reportadas
soya	Leu-Leu-Pro-His-His; Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn; Leu-Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn; Leu-Leu-Pro-His-His
Endospermo de arroz	Fen-Arg-Asp-Glu-His-Lis-Lis; Lis-His-Asp-Arg-Gli-Asp-Glu-Fen
Garbanzo	Asn-Arg-Tir-His-Glu
Colza	Pro-Ala-Gli-Pro-Fen

#### - Actividad quelante de metales

La actividad quelante de metales previene la generación de ROS, debido a que los metales de transición están involucrados en muchas reacciones de oxidación. Gallegos y col. (2011) nos detalla que los péptidos que tienen la actividad de quelar metales pueden aumentar el zinc, hierro y calcio elementos esenciales en el organismo (49) (50).

El nombre quelato se deriva de la palabra griega “Chela”, que significa pinza, y eso es porque cuando se forma el quelato es similar a los brazos de una pinza con el metal entre ellas. Los iones metálicos siempre están en solución acuosa es decir rodeados por moléculas de agua, cuando estas moléculas son reemplazadas por un agente quelante (ligandos) formando un complejo en anillo llamado quelatación, como se observa en la figura 7.

Los metales pesados no pueden ser metabolizados en el cuerpo humano por lo tanto estos permanecen en él causando toxicidad cuando se combinan con otras sustancias, es por ellos que se buscan fuentes de agentes quelantes para poder prevenir dichos efectos tóxicos, los complejos formados por los agentes quelantes de metales no son perjudiciales para el organismo y se eliminan de forma intacta.



**Figura 7.** Formación del Quelato (50)

### 3. Métodos para la determinación de la Actividad Antioxidante

Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPO, FRAP y ORAC.) son utilizados para determinar la capacidad antioxidante de los distintos tipos de alimentos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales en los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (EROs).

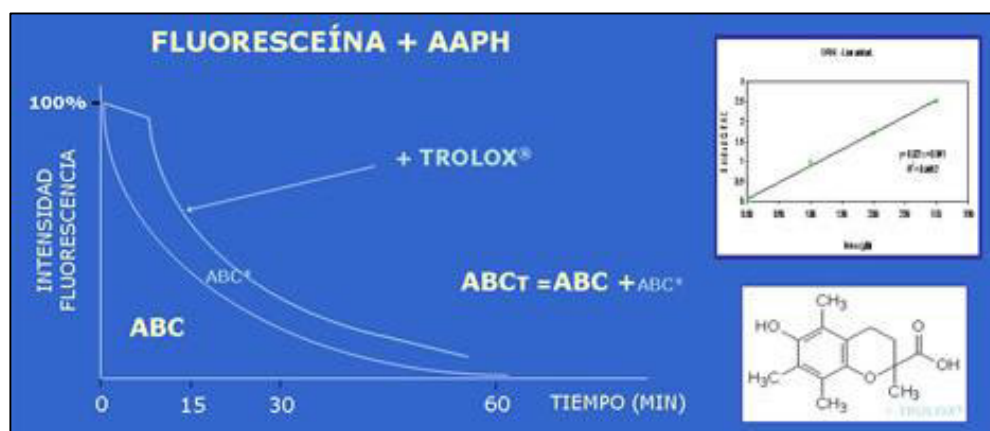
Asimismo se conocen diferentes métodos para la determinación de la actividad antioxidante que podemos separar en dos: ensayo de la capacidad secuestradora contra EROs específicos (captación de radicales de oxígeno (ORAC), TRAP, ensayos basados en el luminol) y los ensayos de la capacidad secuestradora contra radicales estables (radical ABTS, DPPH, FRAP).

Para lo cual detallamos los siguientes:

#### - **Determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno**

Se evaluó la capacidad antioxidante mediante el método de ORAC, el cual mide la capacidad del antioxidante en presencia de un daño oxidativo. Este método inicia con el 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) quien es el radical iniciador, que va a generar el radical peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ) por una descomposición térmica, una vez generado el radical se realiza una transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante a los radicales peroxilos ( $\text{ROO}\cdot$ ) libres, estos reaccionan con la fluoresceína y forman un compuesto no fluorescente. Por lo tanto la pérdida

de la fluorescencia de la fluoresceína indica su oxidación por el radical peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ) como se observa en la figura 8 (51) (52).



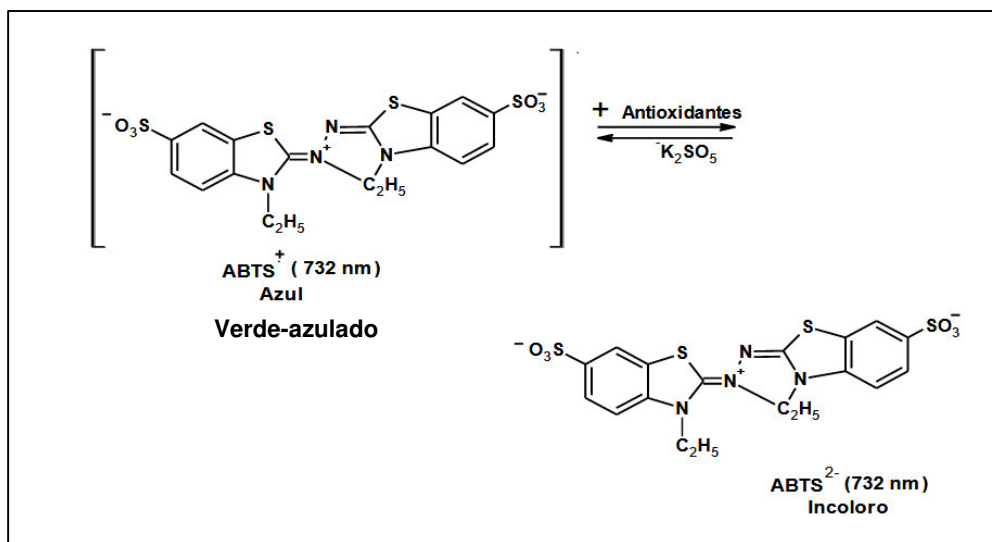
**Figura 8.** Representación de la pérdida de fluorescencia cuando actúa el radical peroxil (52).

Los antioxidantes son sustancias que detienen o retardar las oxidaciones catalíticas y procesos naturales que se producen por el aire, luz, iones metálicos. Como por ejemplo el (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trólox), es universalmente empleado como estándar en diversos estudios de la actividad antioxidante, este es un análogo de la vitamina E.

#### - **Determinación de la capacidad captadora de radical de ABTS<sup>+</sup>**

En este método, el producto de la oxidación del ABTS, el catión-radical de larga vida  $\text{ABTS}^+$ , se presenta como una excelente herramienta para determinar la actividad antioxidante de moléculas donadores de hidrógeno. El método original de ABTS estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes. La técnica mejorada para la generación del radical catión  $\text{ABTS}^+$  (Figura 9), implica la producción directa del cromóforo  $\text{ABTS}^+$  verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) (53).



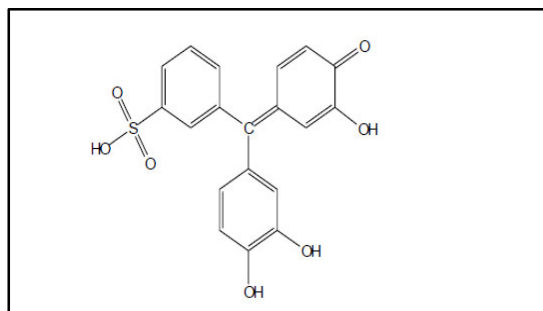


**Figura 9.** Estructura de ABTS<sup>•+</sup> en la reacción con el antioxidante (53).

#### - **Determinación de la actividad quelante de metales**

##### **Actividad quelante de cobre**

Los metales que presentan más de una valencia tienen a querer estabilizarse, tenemos al cobre que presenta más de un estado de oxidación por lo tanto este puede aceptar y donar electrones. El cobre puede formar complejos rápidamente con los aminoácidos (54). De esta manera tiene la predisposición a generar radicales libres tales como el radical hidroxilo y el anión superóxido, por lo tanto en este estudio se realizó el método de quelación de cobre mediante el uso de el colorante pirocatecol violeta (figura 10), el cual es formado a partir de dos moles de pirocatecol con un mol de anhídrido de ácido o-sulfobenzoico, que tiene la propiedad de formar complejos con los metales de color azul violáceo.

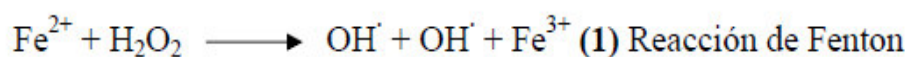


**Figura 10.** Estructura de pirocatecol violeta (54).



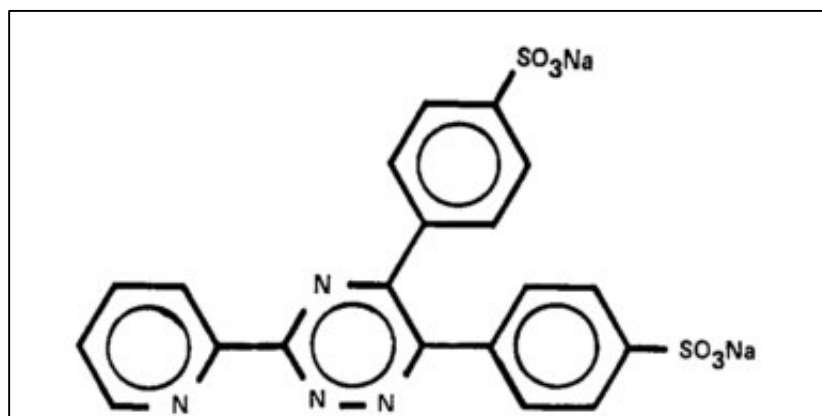
### Actividad quelante de hierro

El hierro es un metal que contribuye a la formación de especies reactivas de oxígeno (50) especialmente genere  $\cdot\text{OH}$  un ejemplo es la reacción de Fenton en la cual los metales actúan como agentes catalíticos como se observa en la figura 11, resultando en la formación de radicales libres (55).



**Figura 11.** Reacción de Fenton (50).

Se conocen que algunos compuestos con ciertos elementos en su estructura (N=C, N) pueden reaccionar con algunos iones metálicos como el caso de la ferrozina reacciona con el ion ferroso (56), sin embargo la mayoría de los complejos son inestables y la formación de ellos están en un rango de pH estrecho.



**Figura 12.** Estructura de la ferrozina (56).

#### 4. Alternativas tecnológicas para la obtención de péptidos bioactivos

Se pueden obtener péptidos bioactivos por tres metodologías: la fermentación utilizando cultivos iniciadores de proteólisis, también mediante enzimas que sean

obtenidas por microorganismos y la hidrólisis enzimática mediante enzimas digestivas (46).

- **Hidrólisis enzimática**

La hidrólisis enzimática es la forma más común de obtener péptidos, utilizando las enzimas gastrointestinales generalmente pepsina y tripsina, también otras enzimas e incluyendo proteasas. En el siguiente cuadro (tabla 4) se muestran los diferentes modelos de hidrólisis enzimáticas utilizando diferentes enzimas para la obtención de péptidos bioactivos.

**Tabla 4.** Obtención de péptidos mediante hidrólisis enzimática.(46).

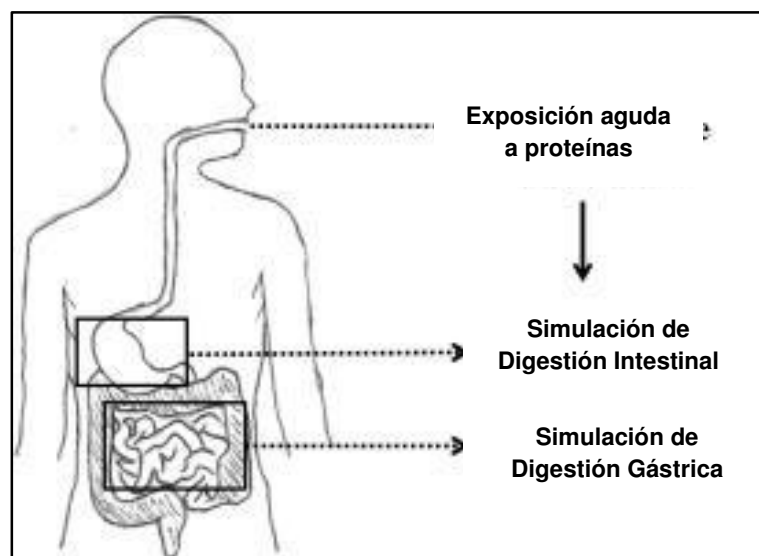
ENZIMA	PÉPTIDO OBTENIDO
Tripsina, pepsina, $\alpha$ -quimiotripsina o pancreatina	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I, quelante de calcio, antioxidantes, hipocolesterolemios (35) (57) (58).
Alcalasa	Fosfolípidos quelantes, hipertensivos (59) (57).
Papaína, flavorenzima	Antioxidantes (57).
De origen no animal	Promotores del crecimiento (57).
Termolasa	Anticancerígeno (57).
Tratamiento secuencial con pepsina y pancreatina	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (57).

- **Modelo de digestión gastrointestinal**

Las proteínas y péptidos derivados de alimentos pueden ser importantes funciones en el tracto gastrointestinal antes de la hidrólisis a aminoácidos y absorción posterior. Estos incluyen regulación de enzimas digestivas y modulación de la absorción de nutrientes en el tracto intestinal. En el caso de las últimas funciones, el papel de los péptidos bioactivos ha sido disputado por un largo tiempo.

La digestión en nuestro organismo empieza desde la ingesta de los alimentos, que inician una pequeña degradación en la boca, formando así el bolo alimenticio, cuando este llega al estómago se encuentra con diversas enzimas sobre todo proteasas principalmente la pepsina y lipasas la cuales empiezan la hidrólisis de proteínas y lípidos en un medio ácido. Luego el quimio ácido es transportado hacia el intestino donde se neutraliza el pH y se encuentran con el jugo pancreático actuando enzimas como tripsina y quiotripsina continuando la hidrólisis como se observa en la figura 13, dentro de todo este proceso se generan una variedad de secuencias peptídicas que pueden ejercer una actividad biológica llamados péptidos bioactivos (60).

La mayor parte de la proteína es absorbida en forma de péptidos y no como aminoácidos libres. Además la acción de las enzimas proteolíticas, los péptidos sufren una digestión adicional mediante peptidasas citoplasmáticas en el intestino. La mayoría de los péptidos de más de tres aminoácidos son hidrolizados extracelularmente por las enzimas borde de cepillo. Mientras que los dipéptidos y tripéptidos pueden ser absorbidos de forma intactos. Dipeptidasas y tripeptidasas pueden posteriormente hidrolizar estos péptidos a aminoácidos, pero parece que algunos de estos pueden escapar al ataque enzimático y alcanzar la circulación sanguínea (6).



**Figura 13.** Digestión gastrointestinal *In Vitro* (60).

- **Hidrólisis con enzimas de origen microbiano**

La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se disuelve o resuspende en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan; a continuación se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis. A medida que ésta progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En los casos de hidrólisis enzimática el pH debe ser mantenido en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. O también puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína finalmente precipitada (61).

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas grado-alimenticio. Estas proteasas pueden ser clasificadas, por su origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico. Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos. La naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere de acuerdo con los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato. El centro activo contiene aminoácidos o bien cationes metálicos que promueven la catálisis, denominándose serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, según intervengan los aminoácidos serina, cisteína o ácido aspártico. En las metaloproteasas la actividad está promovida por un catión metálico, siendo el más frecuente el zinc. Todas las serinproteasas tienen actividad endo. Contrariamente, las metaloproteasas son sobre todo exoproteasas (61).

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico. Los preparados enzimáticos suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se venden en estado líquido o como polvos (61).

## 5. *Erythrina edulis* (pajuro) fuente potencial de péptidos bioactivos

Dentro de toda la variedad de fuentes de origen vegetal encontramos la presencia importante de péptidos en leguminosas, dentro de ellas encontramos a *Erythrina edulis*.

El pajuro es una leguminosa que pertenece al género *Erythrina* (figura 14), según Russo (1984) menciona que es un género tropical y existen más de 100 especies en diferentes partes del mundo (62). Sin embargo Araujo reporta que el género *Erythrina* comprende cerca de 112 especies en diferentes partes del mundo (63).

La mayor parte de especie crece en Sudamérica como Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, su crecimiento en las regiones andinas se da a más de 1.200 m sobre el nivel del mar. En nuestro país crece de manera silvestre en diferentes lugares de la parte andina, sin embargo a pesar de contener gran aporte nutricional no se aprovecha.



**Figura 14.** Semillas de pajuro (62).

Según los estudios sobre su origen no está muy claro, pero al parecer es América de Sur su lugar de origen, fue aprovechado por nuestros antepasados en diversas áreas andinas, y diversos estudios arqueológicos nos relatan la presencia del pajuro en nuestro país, como Shady arqueóloga del asentamiento Caral relata que se identificó tres fases de ocupación de 2540 años a.c, donde se recuperó gran material diverso con presencia de *Erythrina* (pajuro) (64). Según Mayolo (1981) mencionó que en el Perú antiguo se realizaron menestras en base de pajuro (65).

- **Taxonomía.**

En la tabla 5 se muestra la clasificación taxonómica del pajuro

**Tabla 5.** Clasificación taxonómica del pajuro

<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Fabales</i>
<b>Familia</b>	<i>Fabaceae</i>
<b>Tribu</b>	<i>Phaseoleae</i>
<b>Género</b>	<i>Erythrina</i>
<b>Especie</b>	<i>Erythrina edulis</i>

- **Etimología y nombres comunes.**

*Erythrina* nombre genérico que proviene del griego *ερυθρός* (*erythros*) que significa rojo y eso es debido al color rojo de la flor.

Los nombres comunes de *Erythrina edulis* dependen del lugar en **Venezuela:** Frijol, Monpás, Balú y Bucaré. En **Ecuador:** Guato, Sachaporoto, Zapote de cerdo, Frijol de monte, Pashullo, Poroto y Porotón. En **Bolivia** se le dice Sachahabas. En **Colombia:** Chachafruto, Balú, Baluy, Chaporuto, Poruto, Frijol mompás. En **Perú:** se le conoce como Basul, Pajuro, Antiporoto, Pashuro, Poroto, Pisonay (66). Según la distribución geográfica detallada en la figura 15.



**Figura 15.** Distribución geográfica y nombres según cada país (66).

#### - Descripción

El pajuro es de tamaño mediano de 10 a 15 m de alto con presencia de lenticelas y pequeños aguijones puntiagudos (63).

El tallo tiene un diámetro de 37 cm siendo este y las ramas cubiertos por aguijones también, es decir que poseen espinas (67).

Las hojas son alternas con peciolo largo y estos tienen espinas, son de color verde claro y caen del árbol cuando este inicia la floración (66).

Las flores son de color rojo carmín de un tamaño de 2.8 por 1.2 cm, dispuestas en racimos y cada uno de ellos con un número de 190 flores, de todas las flores solo unas 14 se convierten en legumbres maduras (66) (figura 16).



Los frutos son legumbres o también llamadas vainas de color verde de consistencia subleñosa, con constricciones poco profundas de entre 10 a 40 cm de largo y 1.8 y 2.7 cm de ancho, y en promedio contienen a 6 semillas, pero incluso se pueden encontrar frutos de hasta 55 cm (63).

Las semillas son de color marrón claro cuando están frescas y son de color marrón oscuro cuando están maduras y ligeramente rugosas cuando están secas, varían su tamaño de 2 a 5 cm de largo por 1.5 a 2 cm de ancho (63).



**Figura 16.** Árbol de *Erythrina edulis* (pajuro) (63).

A demás de su descripción el pajuro según los pobladores es una planta que tiene larga vida y tiene la capacidad de controlar la erosión de los suelos, prende en lugares áridos y una vez que la planta logra enraizar puede soportar periodos largos de sequía.

#### - **Distribución en el Perú**

Según la investigación de Escamilo (2012) fue cultivada y aprovechada por nuestros antepasados, cultivados también en ceja de selva, en los valles interandinos generados por los ríos Vilcanota, Huallaga, Marañón, Condebamba, Huancabamba y más en la zona norte de nuestro país donde los lugareños de la sierra de La Libertad manifiestan la existencia de esta especie (8).



También se reporta que en los valles de Supe y Pativilca se encontró la especie de *Erythrina edulis* reportado por el arqueólogo Ruiz, en el 2005 en una entrevista Brako y col.(1993) reportaron la presencia de pajuro en los departamentos de Amazonas, Ancash, Apurímac, Cajamarca, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, Pasco, Piura y San Martín (68).

- **Aportes del pajuro**

*Erythrina edulis* es una planta fijadora de nitrógeno en el suelo, esto es debido a que dentro de sus raíces se encuentran las bacterias *Rhizobium cowpea* que al asociarse a la planta aprovechan el nitrógeno del aire y de esa manera enriquecen el suelo donde crece el pajuro (62) (66).

*Erythrina edulis* es una de las especies que no requiere tratamiento una vez que prenda en el suelo según comentarios de pobladores se olvidan de la planta por lo cual no ocasiona gastos para que se pueda mantener (8).

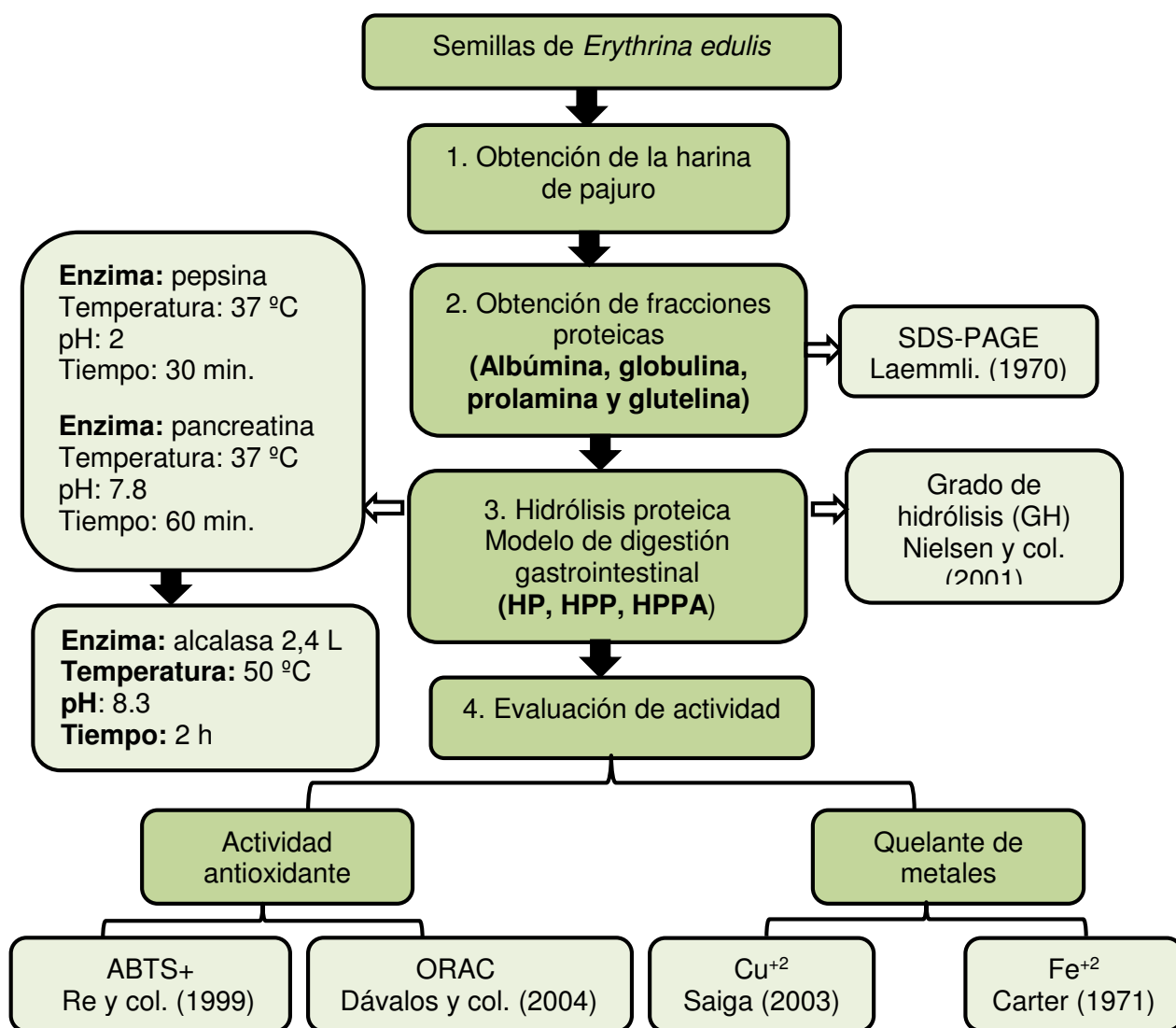
- **Fracciones proteicas del pajuro**

Arango y col. (2012) y Osbore (1907) mediante una extracción por solubilidades determinaron la clasificación de proteínas en leguminosas de la siguiente manera: albumina, globulina, prolamina y glutelina. De las cuatro proteínas las albuminas tienen alto contenido de cisteína y metionina, según trabajos reportan relación entre albumina y globulina de 1:3, 1:6.3, 1:>3 y 1:4 para la lenteja, frijol negro, frijol francés y garbanzo, respectivamente (7) (69).

Siendo el pajuro una especie fácil de crecer, de poco gasto de mantenimiento y con gran aporte nutricional tiene un gran potencial para aportar péptidos bioactivos con actividad antioxidante, quelante de metales y su pronta utilización en la industria alimentaria y/o farmacéutica.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 17 se presenta el esquema de trabajo seguido, desde la obtención de la harina de *Erythrina edulis* hasta la evaluación de la actividad antioxidante y quelante de metales de las fracciones hidrolizadas más abundante.



**Figura 17.** Metodología para la obtención fracciones peptídicas y evaluación de la actividad antioxidante y quelante de metales a partir de semillas de *Erythrina edulis*.

### 1. Obtención de la harina de las semillas de *Erythrina edulis*

Para la obtención de la harina de pajuro, se recolectaron los granos en la ciudad de Trujillo (provincia de Otuzco, mes de agosto 2016). Las semillas fueron peladas y secadas en la estufa marca Barnstead a 40 °C durante 15 días luego se procedió a la molienda con un molino manual para una disminución del tamaño de partícula gruesa y adicionalmente se usó un molino de cuchillas marca Bosh para la obtención de un tamaño más fino capaz de pasar por una malla N°60, la harina obtenida se almacenó en un frasco ámbar a temperatura ambiente hasta su uso.

Para evaluar el rendimiento de la harina de pajuro se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso inicial granos (g)} - \text{Peso final harina (g)}_{\text{final}}}{\text{Peso inicial granos (g)}}$$

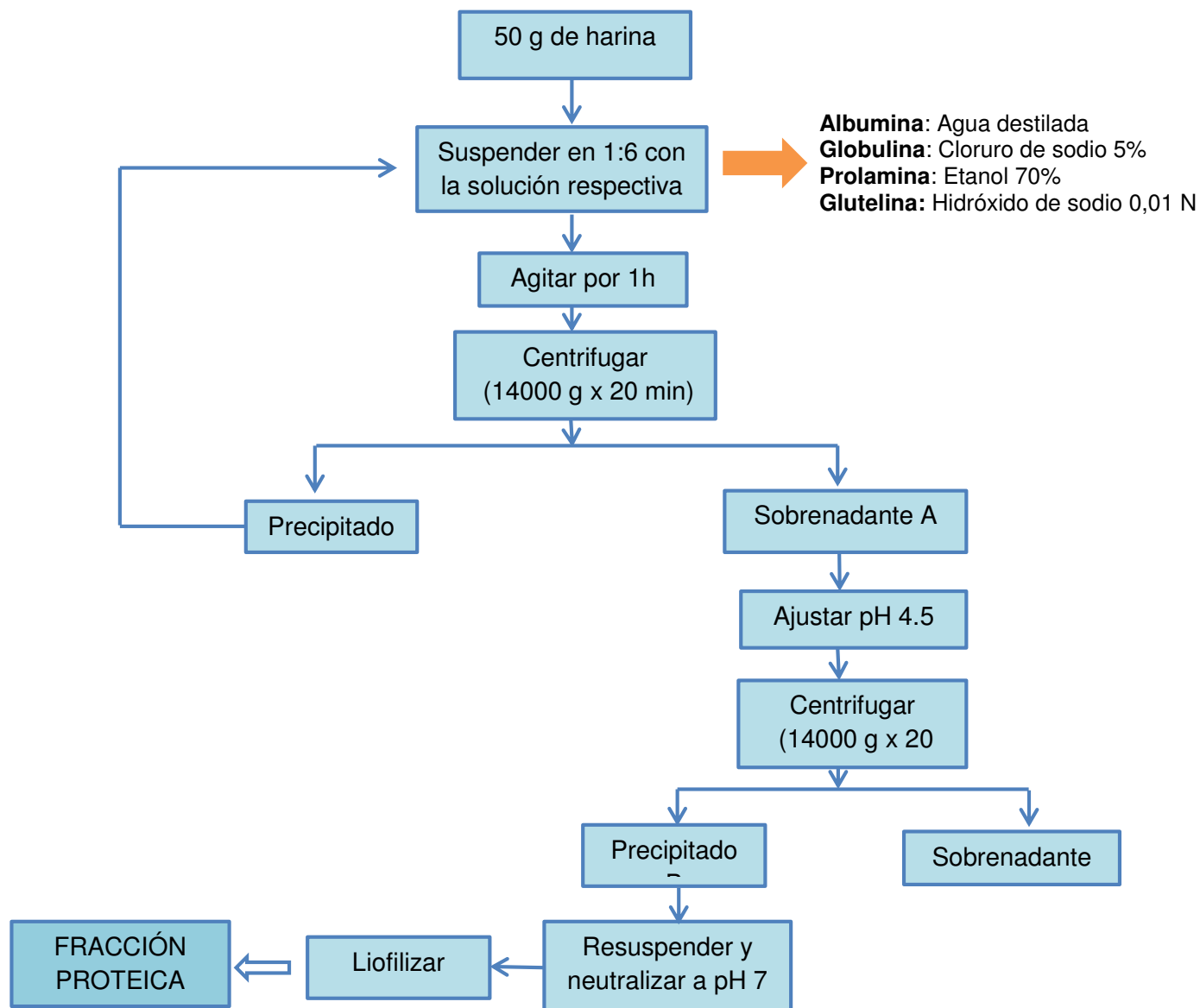
### 2. Análisis proximal de la harina de *Erythrina edulis*

Para los análisis proximales se solicitó los servicios del Centro de Centro Analítico (CCA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM y se realizó según el método de la AOAC 1997.

### 3. Fraccionamiento proteico de la harina de *Erythrina edulis*

Para la obtención de las fracciones proteicas a partir de la harina de pajuro se empleó el método de fraccionamiento secuencial reportado por Chavan y col.(2011) (70) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión de 1:6 (p/v) de harina de pajuro con la solución respectiva, tal como se menciona en la figura 17, y se homogenizó por 1 h en un agitador magnético modelo RCO 10002 marca Ika-Combimag, posteriormente se colocó en una centrífuga modelo 5810R (EPPENDORF) a 14000 g durante 20 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante A, el cual se ajustó a pH 4.5 con ácido clorhídrico 1N. Se obtuvo una precipitación

ligera debido a la disminución de pH, se procedió a centrifugar a 14000 g por 20 min y se resuspendió el precipitado B (Figura 18) en agua bidestilada a pH 7. Finalmente se secó en un liofilizador Labconco a  $-47^{\circ}\text{C}$  y  $7 \times 10^{-3}$  mbar y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Con el precipitado A se sigue la secuencia de extracción con el siguiente solvente, para continuar con el fraccionamiento proteico.



**Figura 18.** Metodología del fraccionamiento proteico a partir de la harina de pajuero (70).

Al finalizar el proceso se evaluó el rendimiento de la fracción obtenida mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso inicial granos (g)} - \text{Peso final harina (g)}_{\text{final}}}{\text{Peso inicial granos (g)}}$$

#### 4. Cuantificación de proteínas

Se empleó dos métodos para cuantificar proteínas de alto peso molecular según Bradford y de bajo peso molecular según el método del ácido bicinconínico.

##### - **Cuantificación por el método de Bradford**

##### **Fundamento:**

Este método se basa en la unión del colorante azul de Coomassie a la proteína soluble, cuando el colorante se une a la proteína soluble pasa de color rojo a azul provocando un aumento en la absorbancia a 595 nm. La formación del complejo es tan solo en min y estable, haciendo el método rápido y reproducible, pero tiene la desventaja de ser bastante sensible a contaminantes como buffer altamente alcalinos y también a los detergentes que causan una gran interferencia (71).

##### **Procedimiento:**

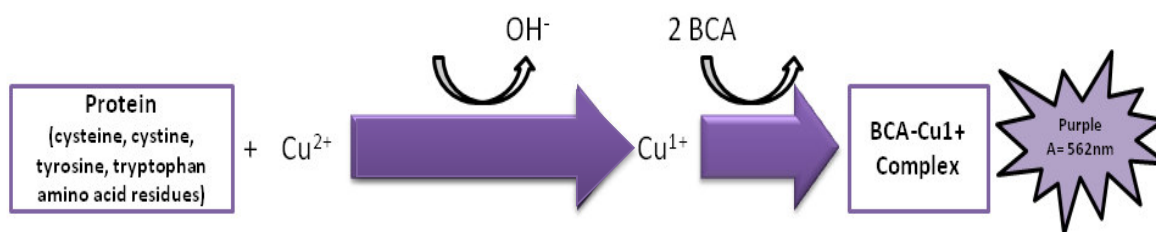
Para la medición de la concentración en el concentrado proteico en cada fracción obtenida, se realizó una dilución de 1 en 10 de la muestra respectiva y se colocó en una placa de 96 pocillos, posteriormente se agregó el reactivo de Bradford y se leyó en un fluorímetro marca Infinite 200Pro a una longitud de onda de 595 nm. Para este método se usó como estándar la albumina de suero bovino (BSA).

## - Cuantificación por el método de BCA

### Fundamento:

El método de Ácido biconínico (BCA) se basa en la reacción de Biuret en el cual la proteína con el  $\text{Cu}^{2+}$  en un medio alcalino, y dos moléculas del ácido biconínico forma un complejo  $\text{BCA-Cu}^+$  de color púrpura a 562 nm. Este método es altamente sensible y altamente selectivo a la detección de  $\text{Cu}^+$  (72,73).

En la figura 19 siguiente se resume el fundamento del método de BCA.



**Figura 19.** Fundamento del método del ácido biconínico (BCA) (72).

### Procedimiento:

En este método se trabajó con la solución A: ácido 2,2'-bichinolina-4,4'-dicarboxílico (BCA, SIGMA) y la solución B:  $\text{CuSO}_4$  al 4 %, en una relación de 50:1 respectivamente. En una placa de 96 pocillos se colocó 10  $\mu\text{L}$  de muestra (fracciones peptídicas) y 15  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada, luego se adicionó 200  $\mu\text{L}$  del reactivo previamente preparado. Se incubó por 30 min a 37 °C y se leyó a 562 nm. Todas las muestras se trabajaron por triplicado.

Para este método se preparó una curva de calibración con albumina de suero bovino (BSA).

## 5. Electroforesis (SDS-PAGE)

### Fundamento:

La electroforesis es un método de separación de proteínas en consecuencia de sus cargas y la influencia de un campo eléctrico, y también puede ser usado como

un criterio de pureza de la muestra. La poliacrilamida es un soporte usado frecuentemente porque no interfiere con la muestra, y la formación del gel es por la polimerización vinílica del monómero de acrilamida y bis-acrilamida, se inicia la polimerización por la formación de radicales libres del monómero por interacción entre el N, N, N, N'-tetrametilendiamina (TEMED) usado como agente reductor y el persulfato de amonio como agente oxidante. Se emplea el dodecilsulfato de sodio (SDS) para determinar el peso molecular de las proteínas, las que se cargan positivamente y se separan en base a su tamaño molecular (74). Este método se denomina electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y fue desarrollado por Laemmli (75).

**Procedimiento:**

Se prepararon dos soluciones una para la formación del gel de separación y el gel de empaquetamiento de la siguiente manera:

Para el gel de separación se utilizó 1.5 mL de solución A (solución de acrilamida-bisacrilamida en una proporción de 30 % y 80% (p/v) respectivamente), 1.5 mL de solución B (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 con 0.4% de SDS), 3  $\mu$ L de agua bidestilada, 30  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% y 12  $\mu$ L de TEMED.

Para el gel de empaquetamiento se utilizó: 250  $\mu$ L de solución A (solución de acrilamida-bisacrilamida en una proporción de 30% y 0.8% (p/v) respectivamente), 500  $\mu$ L de solución C (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 con 0.4% de SDS), 1.25 mL de agua bidestilada, 15  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% y 5  $\mu$ L de TEMED.

Se añadió 10  $\mu$ g de muestra con el tampón de carga y se llevó a ebullición por 4 min, una vez colocadas las muestras en el gel, se llenó la cubeta con el buffer Tris-HCl 25 mM a pH 8.4, glicina 0.19 % y SDS a 0.1 % a un voltaje inicial de 100 V por 6 min y luego 200 V durante 50 min.

Para la coloración de las proteínas separadas se utilizó azul brillante de Coomassie durante 1 h, seguidamente se decoloró el gel con una solución de metanol/ácido acético al 10 % (v/v).

## **6. Obtención de fracciones peptídicas**

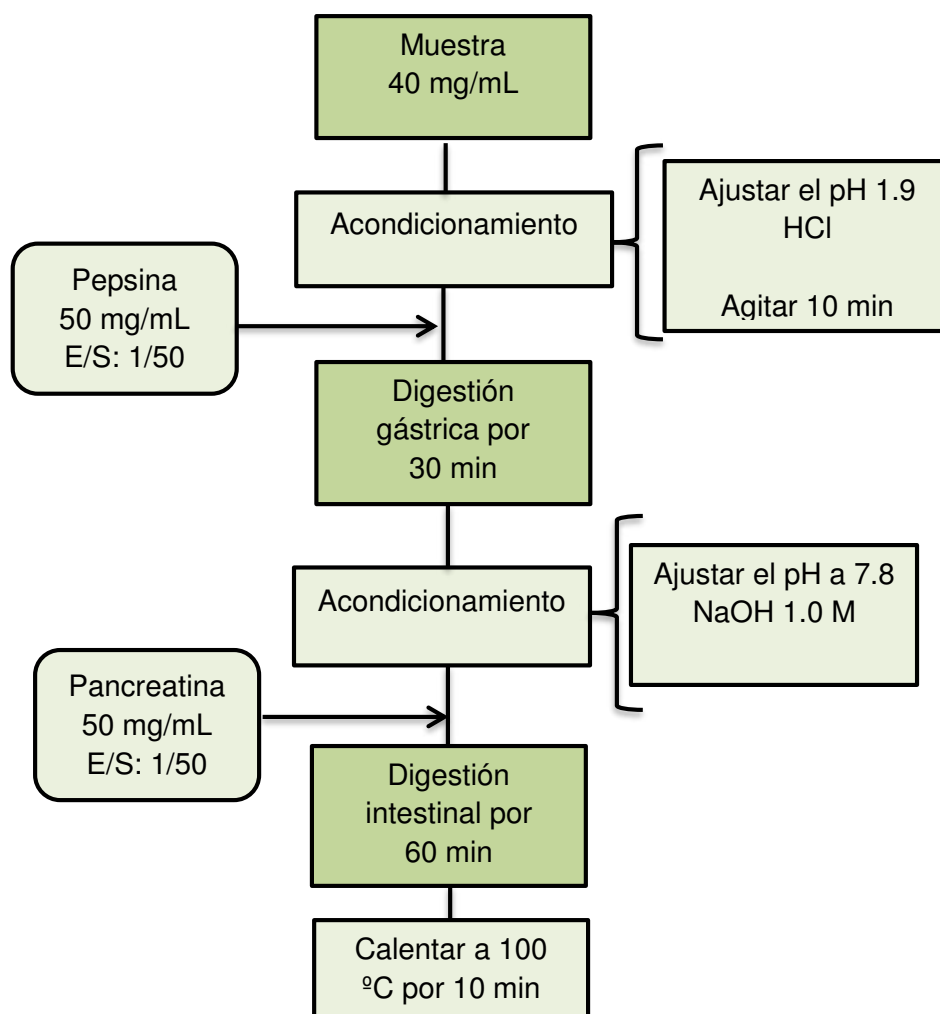
La hidrólisis proteica es la acción de enzimas sobre las proteínas, convirtiéndolas en péptidos y aminoácidos, esta hidrólisis no es una sola reacción sino es un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces peptídicos realizada en un medio, teniendo el control de la relación E/S, temperatura, tiempo, pH. Para terminar la hidrólisis se inactiva la enzima mediante cambio de pH o temperatura.

### **a. Hidrólisis de las proteínas de pajuro utilizando un modelo de digestibilidad gastrointestinal *In Vitro***

#### **Fundamento:**

Para la obtención de péptidos bioactivos se pueden utilizar diferentes metodologías una de ellas es la digestibilidad mediante el uso de enzimas digestivas como la pepsina y pancreatina, la hidrólisis de las proteínas va a depender de su estructura tridimensional, mientras las proteínas tengan una forma globular van a presentar mayor resistencia a la digestibilidad (61). Este proceso depende mucho del pH, debido a que se simula la digestión gastrointestinal “*In Vitro*” la cual que tiene una primera etapa ácida y finalmente una etapa alcalina. Para determinar la digestibilidad proteica se siguió la metodología de Vilela (2006) (76) con modificaciones como se detalla en la figura 20.





**Figura 20.** Método de digestibilidad proteica (76).

#### **b. Hidrólisis secuencial con la enzima alcalasa**

Seguidamente a la digestión con pepsina y pancreatina se realizó la hidrólisis con alcalasa para poder obtener un mejor grado de hidrólisis. La alcalasa es una enzima de origen microbiano más utilizada para la obtención de péptidos bioactivos, ya que presenta una amplia especificidad e hidroliza la mayoría de los enlaces peptídicos que contengan residuos aminoácidos aromáticos, así como extremos carboxílicos que contengan residuos como leucina, tirosina y valina. El pH óptimo de la alcalasa es entre 6.5 y 8.5, siendo rápidamente inactivada con un pH de 5 y por arriba de 11 (38).

**Procedimiento:**

La digestibilidad proteica se realizó con las fracciones más abundantes del pajuro: albumina, globulina y glutelina. Como se observa en la figura 20, estas se disolvieron en agua bidestilada en un porcentaje de 4% (p/v) con respecto a las proteínas, se centrifugaron a 2500 g por 10 min, el sobrenadante se llevó a una temperatura de 92 °C por 10 min. Luego se procedió a ajustar el pH a 1.9 con HCl 1 M, se agitó por 10 min, se adicionó la pepsina (mucosa gástrica porcina) 0,7 FIP- U/mg, preparada al instante, en una relación de enzima sustrato de 1:50, finalizado los 30 min de la digestibilidad gástrica, se detuvo la hidrólisis incrementando el pH a 7,8 con NaOH 1 M, de esta manera se alcalinizó el medio para la acción de la pancreatina (proteasa páncreas porcino) 350 FIP- U/g, preparada en una relación de enzima sustrato de 1:50 y se incubó por 60 min a 37 °C, se paró la reacción aumentando la temperatura a 100 °C por 10 min, seguidamente al hidrolizado con pepsina y pancreatina se le añadió la enzima comercial alcalasa, para lo cual el hidrolizado se llevó a las condiciones óptimas de trabajo, a pH 8.3 y 50 °C por un tiempo de 2 h, tomándose alícuotas en los tiempos de 15, 30, 60 y 120 min.

Se determinó la digestibilidad proteica *In Vitro* mediante la siguiente fórmula:

$$DPIV = \frac{\text{Proteína inicial} - \text{Proteína no digerida}}{\text{Proteína inicial}} \times 100$$

**c. Grado de hidrólisis (GH)****Fundamento:**

La determinación del grado de hidrólisis es fundamental cuando se realiza un hidrolizado, este mide los enlaces peptídicos rotos con respecto a las proteína inicial y es importante tener en cuenta varios factores como la temperatura, pH, concentración de sustrato y sobre todo la naturaleza de la enzima (77). Dentro de los diferentes método para determinar el grado de hidrólisis se trabajó con la determinación de los grupos  $\alpha$ -amino libres, usando como reactivo el

ortoftaldehído (OPA) según la metodología de Nielsen (2001) con modificaciones (78); en el cual se forma un compuesto detectable a 340 nm. Se eligió este método debido a su rapidez, sin embargo, no reacciona con la prolina y lo hace parcialmente con la cisteína.

**Procedimiento:**

Se trabajó con dos soluciones preparadas al momento de usarlas, la solución A: 3.81 g de tetraborato de sodio y 100 mg de SDS se disolvió en 75 mL de agua bidestilada, la solución B: 80 mg de OPA se disuelve con 2 mL de etanol puro y luego se mezclaron las soluciones A y B, se le añadió 176 mg de  $\beta$ -mercatoetanol y se completa el volumen hasta 100 mL obteniendo una solución final. En un tubo se agregó 750  $\mu$ L de la solución final y 100  $\mu$ L de muestra hidrolizada (hidrólisis con pepsina (HP), hidrólisis con pepsina, pancreatina (HPP), hidrólisis con pepsina, pancreatina, alcalasa (HPPA), hidrólisis con pepsina, pancreatina, alcalasa 15 min (HPPA15), hidrólisis con pepsina, pancreatina, alcalasa 30 min (HPPA 30), hidrólisis con pepsina, pancreatina, alcalasa 60 min (HPPA 60), hidrólisis con pepsina, pancreatina, alcalasa 120 min (HPPA 120)), se realizó una dilución de 1:50, se agitó por 5 seg y luego de 2 min se colocó 200  $\mu$ L, de la dilución realizada, en cada pocillo y fue leído a 340 nm.

Se preparó una curva de calibración y se usó como estándar una solución al 1.22 % (p/v) de L- serina, preparada con 30.6 mg de L-serina disuelta en 30 mL de agua bidestilada. Se agregó en tubo 750  $\mu$ L de OPA y 100  $\mu$ L del estándar diluido 1:10 (v/v) se agitó por 5 seg, luego de 2 min, se colocó 200  $\mu$ L de la dilución en cada pocillo y fue leído a 340 nm.

Se obtuvo el hidrolizado total del CP (fracción extraída) mediante una hidrólisis ácida con HCl 6N con 0.1 % de fenol (1:100 v/v) por un tiempo de 6 h a 150 °C y se determinó el grado de hidrólisis del CP siguiendo la metodología mencionada anteriormente.

El grado de hidrólisis se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%GH = \frac{H}{H_{\text{total}}} \times 100$$

H: número de enlaces hidrolizados

H total: número total de enlaces peptídicos por equivalente proteico.

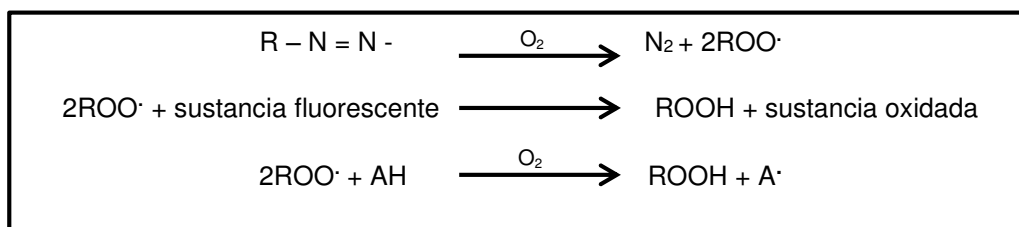
## 7. Determinación de actividad antioxidante

### a. Método de ORAC

#### Fundamento:

Se utilizó el método de captación de radicales de oxígeno (ORAC) el cual mide la transferencia de átomos de hidrógeno y determina la degradación de la fluoresceína (FL) en presencia de radicales de oxígeno, el radical se genera por el azo compuesto, 2,2'-diazobis (2- amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) (79). La disminución de la fluorescencia indica la oxidación de la FL, cuando hay un antioxidante, el radical capta el hidrógeno de este y la FL no es oxidada por lo que la fluorescencia perdura en más tiempo, es decir que al inhibir la caída de la fluorescencia hay mayor actividad antioxidante. El mecanismo se describe en la figura 21.

El método empleado en este trabajo de investigación, fue reportado por Dávalos y col. (2004) (80) con algunas modificaciones, este método tiene alta sensibilidad y precisión.



**Figura 21.** Mecanismo de acción del método de ORAC (80).

Dónde:

R-N=N-R: compuesto azo

ROO·: radical de oxígeno

AH: Antioxidante

### Procedimiento:

En una placa de 96 pocillos se añadió 150 µL de fluoresceína 40 nM y 25 µL de las muestras hidrolizadas y del concentrado proteico a diferentes diluciones como 1:50, 1:100 y 1:200 v/v y, siendo el volumen final de 200 µL, luego se incubó por 30 min a 37 °C y finalmente se le añadió 25 µL del radical 2,2'-Azobis (2-metil-propionamidina) dihidrocloruro 96 mM en tampón fosfato 75 mM. Se leyó por 2 horas cada 2 min a una longitud de onda de emisión 520 y excitación 485 nm.

Se realizó una curva de calibración con Trólox usado como antioxidante de referencia, el cual fue diluido en 500 µL de etanol absoluto, llevado a una fiola de 10 mL y se realizaron las siguientes diluciones mostradas en la tabla 6.

**Tabla 6.** Preparación de la curva de Trólox (80).

Pocillos	Trólox (µL)	H <sub>2</sub> O (µL)
Pocillo 1	5	995
Pocillo 2	12,5	987,5
Pocillo 3	25	975
Pocillo 4	50	950
Pocillo 5	75	925

Se calculó el AUC (área bajo la curva) con la siguiente fórmula:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=60} f_i/f_0$$

Dónde:

AUC: área bajo la curva

fo: fluorescencia inicial en el tiempo 0

fi: fluorescencia medida en función al tiempo i

El AUC neta se obtiene de la siguiente manera:

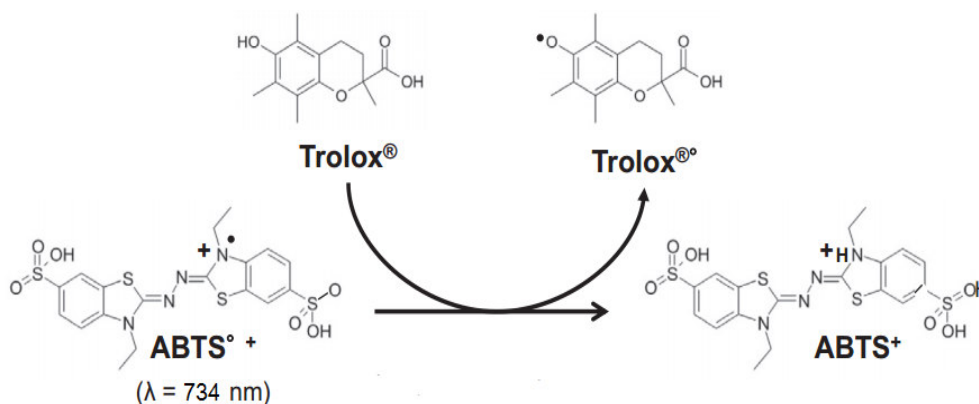
$$\text{AUC neta} = \text{AUC}(\text{antioxidante}) - \text{AUC}(\text{blanco})$$

Finalmente, los valores se expresaron en  $\mu\text{mol}$  equivalente al Trólox (ET) por  $\mu\text{g}$  de muestra.

## b. Método de ABTS

### Fundamento:

Se siguió uno de los métodos más utilizados para determinar la actividad antioxidante, el reportado por Re y col(1999) (81) modificado, el cual se fundamenta en la oxidación del ABTS (Acido 2,2'azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) por el persulfato de sodio formando  $\text{ABTS}^+$  (radical catión coloreado), que es reducido a ABTS por acción de un antioxidante, tal como se observa en la siguiente figura 22.



**Figura 22.** Mecanismo de acción del método de ABTS (81).

**Procedimiento:**

Las fracciones hidrolizadas se diluyeron 1:20 v/v, mientras que los concentrados, 1:5 v/v y se colocó 20 µL de cada una en un pocillo, luego se adicionó 180 µL del radical ABTS+. El control se realizó con agua bidestilada y se leyó a 734 nm.

Se realizaron curvas de calibración con dos antioxidantes usados como estándares: Trólox y ácido ascórbico, el primero a un rango de concentración de 1-10 µg/µL y la siguiente curva con un rango de 0.2-0.7 µg/ mg. Los resultados fueron expresados en µmol de equivalente al Trólox (ET) por mg de proteína y mg de ácido ascórbico por mg de muestra.

- **Determinación de los valores de IC<sub>50</sub> por el método de ABTS**

El IC<sub>50</sub> es la concentración mínima para inhibir el 50% del radical ABTS, para hallar los valores se utilizó la ecuación de la recta para cada muestra analizada (albumina, globulina y glutelina), a menos IC<sub>50</sub> es mayor la actividad antioxidante de la muestra.

Ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Ecuación del IC<sub>50</sub>:

$$IC_{50} = \frac{0.5 - b}{m}$$

Dónde:

*m*: pendiente.

*b*: punto de intersección.

## 8. Actividad quelante de metales

En muchas reacciones de oxidación se utiliza a los metales de transición como catalizadores, por eso se evaluó la actividad quelante de metales como parte de la actividad antioxidante (82).

### a. Capacidad quelante de $\text{Cu}^{+2}$

#### Fundamento:

Se determinó la actividad quelante de cobre con el reactivo pirocatecol violeta (PV) de acuerdo a Saiga (2003) (83) con algunas modificaciones. Este método se basa en una reacción colorimétrica donde los iones  $\text{Cu}^{+2}$  con el PV forman un complejo coloreado azul, al adicionar agentes quelantes (EDTA, muestras con actividad quelante, etc.) este complejo se disocia cambiando de azul a amarillo, indicando un alta actividad quelante de cobre. El mecanismo se observa en la figura 23.



**Figura 23.** Formación del complejo quelante de cobre (83).

#### Procedimiento:

En una microplaca se agregó 50  $\mu\text{L}$  de muestra hidrolizada y 190  $\mu\text{L}$  de buffer acetato de sodio 50 mM a pH de 6, luego se adicionó sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración de 1 mM, se incubó por 7 min y finalmente se añade el reactivo pirocatecol violeta (PV, SIGMA) en una concentración de 7  $\eta\text{M}$  y se midió a una longitud de onda de 632  $\eta\text{m}$ . Se trabajó con EDTA 0.2 mg/mL como control positivo en un rango de 2  $\mu\text{g}$  a 12  $\mu\text{g}$ .

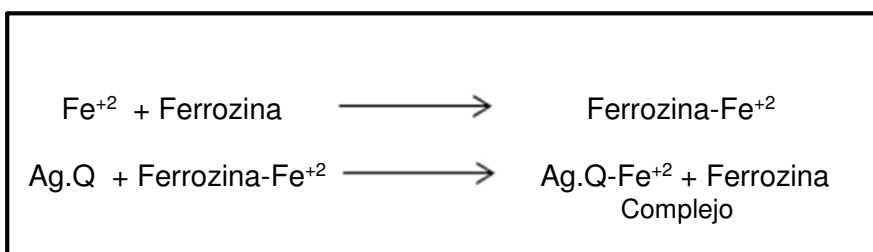
Se obtuvo el porcentaje de quelación de cobre mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Quelante de Cobre(\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Absorbancia muestra } 632 \eta\text{m}}{\text{Absorbancia control } 632 \eta\text{m}} \right) \times 100$$



**b. Quelante de  $\text{Fe}^{+2}$** **Fundamento:**

La actividad quelante se determinó mediante el método de Cartel (1971) (55) con algunas modificaciones, en la que hay una formación del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -Ferrozina con una coloración rosado, cuando interviene un agente quelante, este complejo se disocia y la absorbancia baja, aumentando la quelación. Un factor importante es el pH del medio, el cual debe estar entre 4-5 aproximadamente, de lo contrario se puede generar falsos positivos. La formación del complejo quelante de hierro se muestra en la figura 24.



**Figura 24.** Formación del complejo quelante de hierro (55).

**Procedimiento:**

En una placa de 96 pocillos se adicionó 50  $\mu\text{L}$  entre muestra hidrolizada y 200  $\mu\text{L}$  de buffer acetato de sodio 100 mM con un pH 4.9, luego se adicionó cloruro de ferroso ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , MERCK) en una concentración de 0.01 mg/mL y se dejó incubando por 30 min, finalmente se adicionó el reactivo de sal monosódica de ácido 3- (2 - piridil) - 5,6 - difenil - 1,2,4 - triazina - p, p' - disulfónico (ferrozina, SIGMA ALDRICH) en una concentración de 4 mM y se colocó en un fluorímetro a una longitud de onda 562 nm. Se trabajó con EDTA 0.1 mg/mL con control positivo en un rango de 0.5  $\mu\text{g}$  a 4.5  $\mu\text{g}$ .

Se obtuvo el porcentaje de quelación de hierro mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Quelante de Hierro (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Absorbancia de la muestra } 562 \text{ nm}}{\text{Absorbancia control } 562 \text{ nm}} \right) \times 100$$

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Semillas de *Erythrina edulis*

Las semillas de pajuro, recolectadas de la provincia de Otuzco, La Libertad cosecha 2016, corresponderían a la variedad negra. Barrera (1998) describió que la leguminosa *Erythrina edulis* presenta tres variedades, negra, roja y amarilla, las dos últimas son predominantes en Venezuela, mientras que en nuestro país la más abundante sería la variedad negra.

### 2. Análisis proximal de la harina de *Erythrina edulis*

En la Tabla 6 se presenta los resultados del análisis proximal de la harina de las semillas de pajuro. Las semillas tienen alto contenido proteico (18,60%) y bajo contenido graso (1.31%), además contiene fibra (5.89%) y carbohidratos solubles (54.59%), para el presente trabajo se estudió el contenido proteico por ser la fuente potencial de péptidos bioactivos. El relación a las proteínas, Pérez y col. (1979), reportaron que las semillas de *Erythrina edulis* presentan alto contenido proteico entre el rango de (18 a 25%) (84). Sin embargo, D'Amore (2015) reportó que la variedad roja de pajuro proveniente de Mérida, Venezuela, presenta mayor contenido proteico (25.90%), mientras que la variedad amarilla, del mismo origen, presentó 18% muy similar a las muestras en estudio (85).

**Tabla 7.** Análisis proximal de la harina de pajuro.

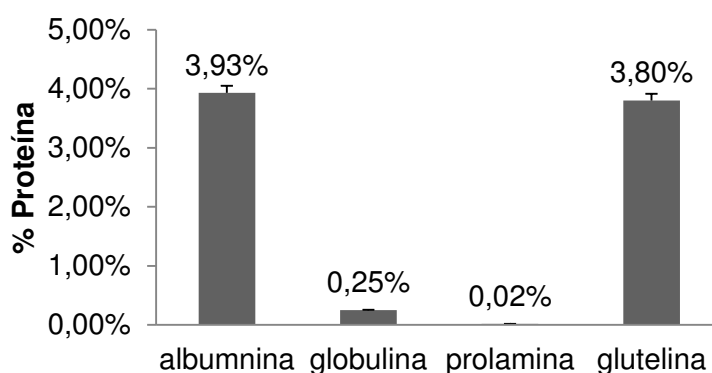
Prueba	Métodos	Porcentaje (%)
<b>Humedad</b>	934.01	10.70
<b>Proteínas</b>	978.04	18.60
<b>Grasas</b>	930.09	1.31
<b>Cenizas</b>	930.07	3.95
<b>Fibra</b>	934.10	5.89
<b>Elementos libre de nitrógeno (ELN)</b>	Por diferencia	59.54

La diferencias reportadas se pueden atribuir a muchos factores tales como el método de extracción empleado, el contenido de humedad de la harina o las condiciones agronómicas del cultivo(7).

### 3. Fraccionamiento proteico de la harina de *Erythrina edulis*

#### Obtención de las fracciones proteicas

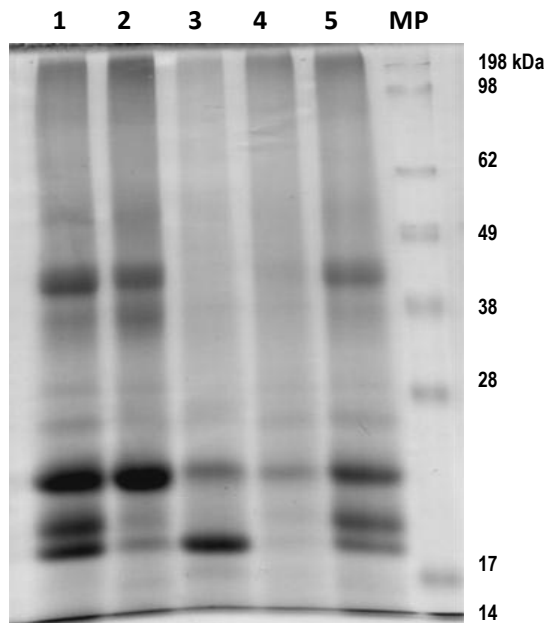
La fracciones proteicas de albúmina, globulina, prolamina y glutelina se obtuvieron mediante el método de Chavan y col. (2011) con algunas modificaciones, el rendimiento de cada fracción se obtuvo a partir de 100 g de muestra de harina, los resultados se presentan en la figura 25 (70).



**Figura 25.** Rendimiento de cada fracción a partir de 100 g.

De las cuatro fracciones obtenidas, las más abundantes correspondían a albúmina y glutelina con porcentajes de 3,95 y 3,80%, respectivamente. La pureza y calidad de cada fracción se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los resultados se pueden visualizar en la Figura 26, en los carriles del 1 al 4 se presenta el perfil electroforético de las fracciones albúmina, globulina, prolamina y glutelina, respectivamente, los perfiles fueron comparados con el concentrado proteico total (carril 5). Se puede apreciar en cada caso bandas proteicas bien definidas que varían en tamaño e intensidad, con pesos aproximados de 18, 20, 22 y 40 kDa (albúmina), 22, 38 y 40 kDa (globulina), 18 kDa (prolamina) y 22 kDa (glutelina).

Del análisis electroforético y del rendimiento obtenido en función de la abundancia se eligieron las fracciones de albúmina, glutelina y globulina, para la hidrólisis enzimática en el modelo de digestión gastrointestinal *In Vitro*. La fracción de prolamina fue la que presentó el rendimiento más bajo, cabe destacar que las leguminosas se caracterizan por el bajo contenido de prolamina.



**Figura 26.** Perfil electroforético de las fracciones proteicas de pajuro donde: 1 albúmina; 2 globulina; 3 prolamina; 4 glutelina y 5 concentrado proteico total.

Arango y col. (2012), realizaron el fraccionamiento proteico a partir de semillas de pajuro de la ciudad de Nariño, Colombia, obteniendo mayor contenido de glutelina, albúmina y globulina (7). En nuestro caso la fracción de albúmina fue la más abundante. Samanta y Laskar (2009), reportaron un mayor contenido de la fracción albúmina en semillas de *Erythrina variegata*, proveniente de Bengal, India (86). La fracción de albúminas resulta muy interesante por ser la más sencilla en aislar porque es soluble en agua y el perfil electroforético muestra 4 bandas bien definidas que podrían ser sustrato de proteasas para la liberación de péptidos con diferentes actividades biológicas.

#### 4. Hidrólisis proteica

##### Modelo de digestibilidad gastrointestinal *In Vitro*

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos (trozos de la proteína) de pequeño tamaño, entre 2 y 22 aminoácidos, inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden activarse al ser liberados (87). En el presente estudio las diferentes fracciones proteicas de albúmina, globulinas y glutelinas fueron hidrolizadas mediante digestión gastrointestinal *In Vitro* utilizando las enzimas digestivas pepsina (HP) y pancreatina (HPP) de forma secuencial, como primera fase para la liberación de péptidos bioactivos. De esta forma los péptidos liberados podrían ser resistentes a la digestión gastrointestinal favoreciendo su biodisponibilidad. Adicionalmente se realizó la digestión con la enzima microbiana alcalasa (HPPA) para favorecer la liberación de otros péptidos con mejores propiedades. Se eligió la enzima microbiana alcalasa por ser una proteasa ampliamente reportada en la obtención de péptidos bioactivos antioxidantes.

**Tabla 8.** Concentración de proteínas por el método de Bradford y porcentaje de digestibilidad *In Vitro* (DPIV) tras la hidrólisis con pepsina (HP), pancreatina (HPP) y alcalasa (HPPA).

	Proteínas (mg/mL)	%DPIV
<b>ALBÚMINA</b>		
CP	18.7	
HP 30	12.1	35.7 ± 1.2
HPP 60	4.5	77.2 ± 1.9
HPPA15	1.6	91.4 ± 1.6
HPPA30	0.1	99.5 ± 0.9
HPPA60	0.0	100.0 ± 1.5
HPPA120	0.0	100.0 ± 1.2
<b>GLOBULINA</b>		
CP	13.7	
HP 30	5.2	62.5 ± 1.5
HPP 60	1.4	74.7 ± 2.5
HPPA15	0.9	93.4 ± 1.9
HPPA30	0.0	100.0 ± 1.3

HPPA60	0.0	100.0 ± 1.8
HPPA120	0.0	100.0 ± 1.2
<b>GLUTELINA</b>		
CP	13.6	
HP 30	9.8	28.1 ± 0.7
HPP 60	8.5	38.1 ± 0.9
HPPA15	6.1	55.1 ± 0.8
HPPA30	4.8	64.7 ± 0.4
HPPA60	2.1	84.5 ± 0.8
HPPA120	1.4	89.7 ± 0.4

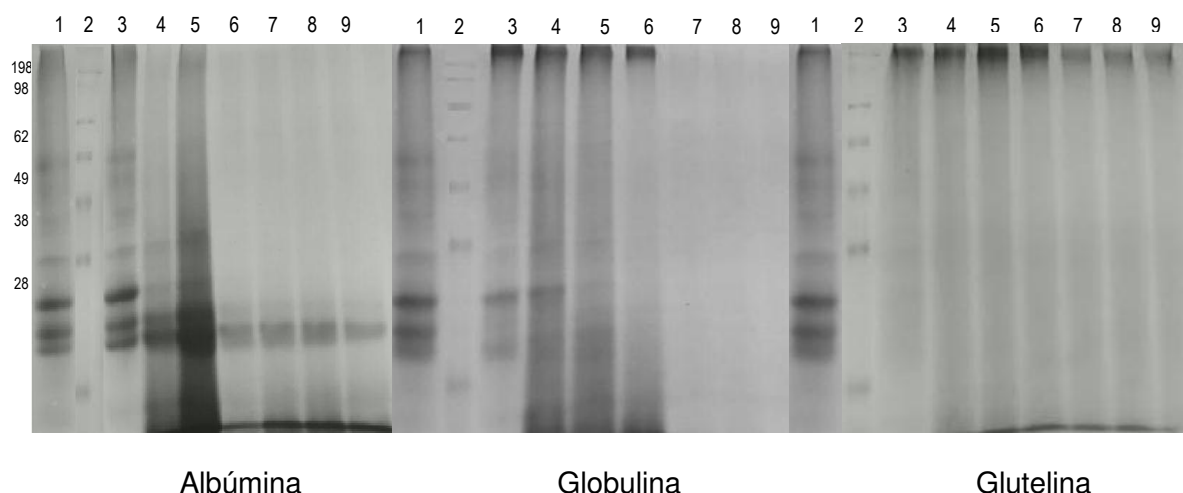
En la tabla 8 se presentan los resultados de concentración de proteínas y porcentaje de digestibilidad *In Vitro* (DPIV) determinados tras la hidrólisis de albúmina, globulina y glutelinas con las enzimas digestivas pepsina pancreatina y la enzima microbiana alcalasa, adicionadas de forma secuencial. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, que se basa en la capacidad del colorante de azul de Comassie de interactuar con proteínas de alto peso molecular, por tanto nos permitió realizar el seguimiento de la hidrólisis de forma indirecta. La concentración inicial de las proteínas representada como CP en cada fracción, fue 18.7; 13.7 y 13.6 mg/ml, respectivamente. Tras la digestión con pepsina (HP), las globulinas se hidrolizaron en más del 60%, comportándose como un buen sustrato para ésta enzima. En el caso de albúmina y glutelina la digestión con pepsina tan solo disminuyó alrededor del 30% la concentración inicial de proteínas. Mientras que la hidrólisis secuencial con pancreatina (HPP) aumento la hidrólisis de proteínas de alto peso molecular, lo cual se reflejó en la disminución de las mismas en más del 75%, en el caso de la glutelina la hidrólisis fue leve (37.5%).

La hidrólisis adicional con alcalasa (HPPA) favoreció de forma considerable la digestión de proteínas de alto peso molecular, a medida que se incrementaba el tiempo de exposición a la enzima resultaba más complicado la cuantificación de las proteínas, incluso se obtuvieron valores indetectables por el método de Bradford, esto debido a que las diferentes fracciones peptídicas liberaban péptidos cada vez más pequeños que se encontraban fuera del rango de sensibilidad del reactivo de Bradford.

En relación al DPIV, las fracciones proteicas de albúmina y globulina presentaron mejor grado de digestibilidad con porcentajes de  $77.2 \pm 1.9$  y  $74.7 \pm 2.5\%$ , respectivamente. Los valores de DPIV de una proteína ideal con alto grado de digestibilidad, con superiores al 90% como la clara de huevo y la leche. En nuestro caso la hidrólisis adicional con alcalasa incrementó el % de DPIV por encima al 90% desde los 15 min de exposición en las fracciones de albúmina y globulina. A los 120 min de exposición el %DPIV fue alrededor del 100%. Incluso la glutelina que presentó un %DPIV bajo, con la adición de alcalasa, alcanzó valores cercanos al 90% a los 120 min de digestión.

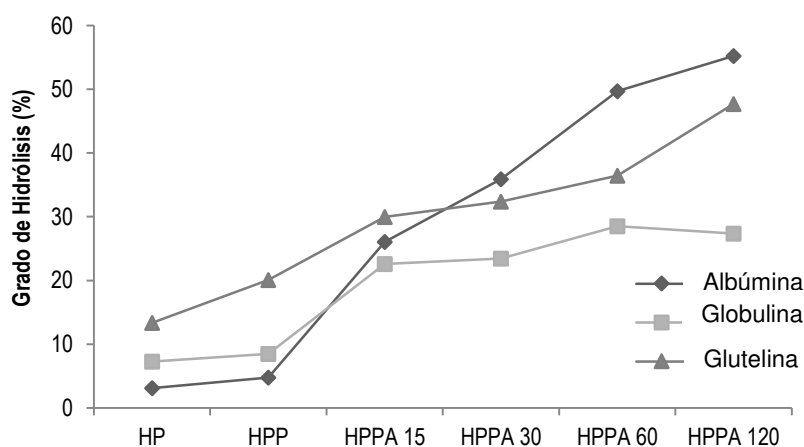
Por tanto, la adición de alcalasa mejoró considerablemente la digestibilidad hasta valores equiparables a las que alcanzan las proteínas ideales de origen animal. Por tanto, la hidrólisis secuencial pepsina, pancreatina y alcalasa se presenta como una estrategia interesante para mejorar el grado digestibilidad de proteínas vegetales.

En la Figura 27 se presenta el perfil electroforético de albúmina, globulina y glutelina antes de la digestión enzimática (carril 3) y tras la digestión secuencial con pepsina (carril 4), pancreatina (carril 5) y alcalasa a diferentes tiempos de exposición 15, 30, 60 y 120 (carriles 6-9). Se aprecia una disminución de las bandas proteicas de forma ligera en el caso de pepsina y pancreatina, en el caso de alcalasa se observó que a medida que se incrementaba el tiempo de exposición, a las diferentes proteasas, se generaban péptidos de menor tamaño. En el caso de albúmina se produjo algo peculiar, si bien las bandas proteicas fueron desapareciendo en función de la proteasa utilizada y tiempo de exposición, se pudo observar dos bandas 20 y 22 kDa resistentes a la degradación con pepsina, pancreatina y alcalasa en comparación con las demás fracciones extraídas, estos resultados fueron similares a los reportados por Intiquilla y col. (2016) quienes hidrolizaron las proteínas de las semillas de pajuro con las enzimas microbianas alcalasa, flavorzima y neutrasa (88).



**Figura 27.** Perfil electroforético en SDS-PAGE al 10% de los hidrolizados proteicos de albumina, globulina y glutelina aisladas de las semillas de pajuro. 3 Fracción proteica, 4 Hidrólisis con pepsina, 5 pepsina-pancreatina y 6, 7, 8 y 9 pepsina-pancreatina-alcalasa en los tiempos de 15, 30, 60 y 120 min.

Para el seguimiento de la hidrólisis también se cuantificó la liberación de grupos aminos libres, mediante el método del ortoftaldehído, expresado como porcentaje de grado de hidrólisis (%GH). El 100% de GH corresponde a la cuantificación de todos los grupos amino libres presentes en la muestra problema, liberados tras la hidrólisis ácida a HCl 6 N, a 121 °C y 15 Pa de presión.



**Figura 28.** Determinación del grado de hidrólisis expresado en porcentaje de los hidrolizados proteicos de albúmina, globulina y glutelina con las enzimas pepsina (HP), pepsina y pancreatina (HPP), pepsina. Pancreatina y alcalasa (HPPA) en los tiempos de 15, 30, 60 y 120 min.



El GH con las enzimas pepsina y pancreatina alcanzó valores de  $5.52 \pm 0.6$ ,  $8.48 \pm 0.2$ ,  $20.07 \pm 0.9\%$ , para albúmina, globulina y glutelina; respectivamente. Estos valores mejoraron tras la hidrólisis secuencial con alcalasa alcanzando valores máximos de  $55.23 \pm 1.8$ ,  $27.36 \pm 0.9$ ,  $47.72 \pm 1.18\%$ , respectivamente, a los 120 min de digestión (Figura 28).

## 5. Determinación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó, en las fracciones peptídicas de albúmina, globulina y glutelina, obtenidas tras la hidrólisis enzimática con pepsina, pancreatina y alcalasa, utilizando los métodos de captación de radicales oxígeno (ORAC-FL) y de ABTS utilizando como referencia los antioxidantes Trólox y vitamina C.

Los resultados se presentan en la Tabla 9 expresados como capacidad antioxidante equivalente al Trólox (TEAC en  $\mu\text{mol ET/g}$  de proteína) para el método ORAC-FL, La actividad antioxidante de los CP sin hidrolizar fue de  $894.3 \pm 0.3$ ,  $1192.1 \pm 1.8$  y  $801.2 \pm 4.8 \mu\text{mol ET/g}$  de proteína para albúmina, globulina y glutelina respectivamente. Estos valores se incrementaron en más del 200% tras la hidrólisis secuencial pepsina-pancreatina-alcalasa, de forma estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) alcanzando valores de  $4957 \pm 351$ ,  $5177 \pm 0.023$  y  $2227 \pm 0.223 \mu\text{mol de ET/mg proteína}$ , respectivamente por el método de ORAC-FL.

**Tabla 9.** Resumen de la actividad antioxidante.

MUESTRAS		ORAC-FL	ABTS	
Muestras		TEAC ( $\mu\text{mol ET/g}$ )	TEAC ( $\mu\text{mol ET/g}$ )	VCEAC (mg Vit. "C" /g)
CP	ALBUMINA	$894.3 \pm 0.3$	$370.2 \pm 6.0$	$346.0 \pm 1.1$
	GLOBULINA	$1192.1 \pm 1.8$	$438.1 \pm 6.0$	$403.0 \pm 1.6$
	GLUTELINA	$801.2 \pm 4.8$	$549.1 \pm 3.1$	$506.3 \pm 2.7$
HPPA 120	ALBUMINA	$4957.2 \pm 35.1^{a,d}$	$2866.3 \pm 36.0^{a,d}$	$578.2 \pm 7.0^a$
	GLOBULINA	$5177.2 \pm 23.0^{b,d}$	$3172.3 \pm 10.9^{b,d}$	$676.1 \pm 2.3^{b,d}$
	GLUTELINA	$2227.3 \pm 22.3^c$	$2016.2 \pm 37.0^c$	$393.7 \pm 7.0^c$

<sup>a,b,c</sup>  $p < 0.05$  vs CP albúmina, globulina y glutelina respectivamente; <sup>d</sup>  $p < 0.05$  vs HPPA glutelina, (Test student-Newman-Keuls).

Los HPPA de albúmina y globulina, fueron los que presentaron una mayor actividad antioxidante, con valores de ORAC-FL de 4957.2 y 5177.2  $\mu\text{mol ET/g}$  respectivamente, los valores fueron superiores a los reportados por Intiquilla y col. (2015) quienes determinaron la capacidad antioxidante por el método de ORAC-FL, en semillas de pajuro provenientes de la ciudad de Otuzco, La Libertad. Los autores hidrolizaron el contenido proteico total utilizando la enzima alcalasa, adicionalmente fraccionaron las proteínas en función del tamaño utilizando membranas de diferente corte molecular, reportando valores entre 726 y 1176  $\mu\text{mol ET/g}$ , destacando la actividad antioxidante en la fracción menor a 3 kDa (89).

Por el método de ABTS se determinó los valores de TEAC y VCEAC. Las fracciones hidrolizadas presentaron valores de TEAC superiores en más de 6 veces comparados con sus respectivos CP sin hidrolizar. Del mismo modo, la capacidad antioxidante expresada como VCEAC también fue superior a los CP sin hidrolizar en 1.3 veces. En ambos casos los resultados fueron estadísticamente superiores con un nivel de significancia de 0.05. Los valores de TEAC de globulina hidrolizada (3172.3  $\mu\text{mol ET/g}$ ) fueron superiores a los reportados por Intiquilla (2015) con la fracción F3 (636.2  $\mu\text{mol ET/g}$ ), utilizando el mismo método (89).

En el método del ABTS la actividad antioxidante también se expresó como  $\text{IC}_{50}$  (cantidad de muestra problema capaz de inhibir en un 50% la liberación del radical ABTS). Los mejores valores se encontraron en los hidrolizados HPPA de globulina y albúmina con 7 y 7,08  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabla 10), comparados con Durak y col.(2013) que reportaron valores de  $\text{IC}_{50}$  para hidrolizados de globulina, albúmina y glutelina de semillas de frijol de 0.54, 0,89 y 1.12  $\text{mg/mL}$ , respectivamente (90) por lo que se puede decir que nuestras fracciones hidrolizadas tienen mejor actividad antioxidante. Por otro lado, Alashi y col (2014) evidenciaron  $\text{IC}_{50}$  similares a nuestras fracciones en hidrolizados proteicos de 1 y 1-3 kDa de *Australian canola* digeridos con alcalasa y quimiotripsina de forma independiente, con valores de 11,2 y 14,4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (91). Según lo reportado nuestras fracciones hidrolizadas se les puede considerar buenos péptidos antioxidantes según la clasificación de Ramos y col. (2003) (92).

**Tabla 10.** Actividad antioxidante mediante el método ABTS expresada IC<sub>50</sub>

Muestras	ABTS IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	CP	HPPA120
ALBUMINA	31.30 ± 2.63	7.08 ± 0.89 <sup>a,d</sup>
GLOBULINA	26.62 ± 3.15	7.00 ± 0.62 <sup>b,d</sup>
GLUTELINA	27.53 ± 4.08	10.78 ± 0.21 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> p<0.05 vs CP albúmina, globulina, glutelina respectivamente; <sup>d</sup> p<0.05 vs HPPA glutelina, (Test student-Newman-Keuls).

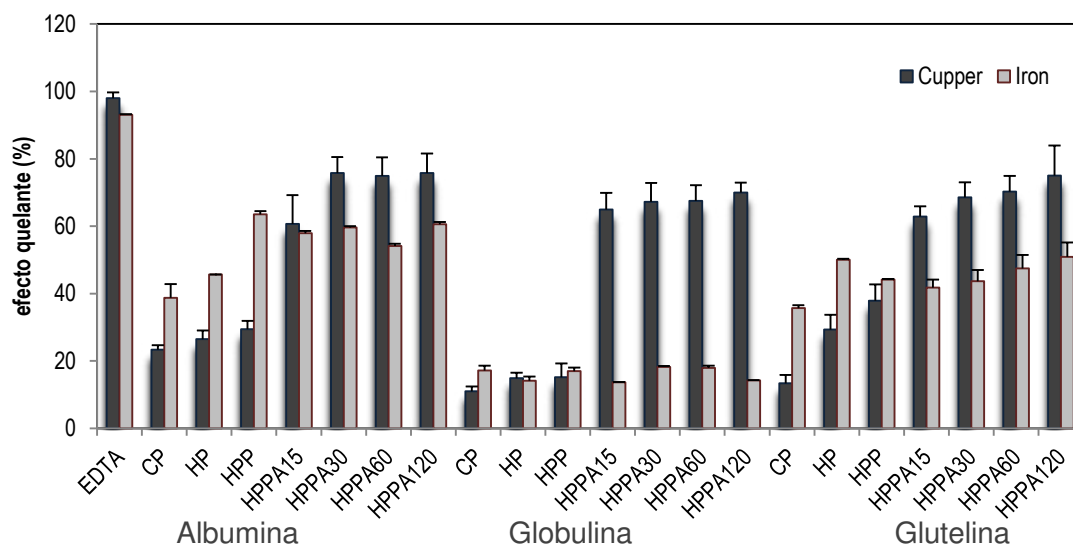
### Determinación de la actividad quelante de metales

Los metales de transición como el hierro y cobre en su forma iónica pueden actuar como catalizadores en la formación de especies reactivas de oxígeno, incluso el Fe<sup>+2</sup> puede inducir la formación de aniones superóxidos formando radicales hidroxilos peligrosos causantes de daño tisular (93).

Además de la actividad antioxidante también se determinó la actividad quelante de Cu<sup>+2</sup> y Fe<sup>2+</sup>, debido a que estos principales metales están implicados en procesos de estrés oxidativo, al ser capaces de capturarlos ayudarían a contrarrestar los efectos deletéreos que éstos metales (93).

La actividad quelante de metales se realizó en las fracciones proteicas (albúmina, globulina y glutelina), en los diferentes hidrolizados con pepsina HP, pepsina-pancreatina HPP y pepsina-pancreatina-alcalasa HPPA a los 120 min de digestión.

En la figura 29 se presenta un barrido de la actividad quelante de metales de hierro y cobre. Se puede apreciar el aumento de la actividad quelante, en ambos casos, en función del tiempo de hidrólisis. Cabe resaltar que los hidrolizados preparados presentaron mejor capacidad quelante de cobre.



**Figura 29.** Actividad quelante de cobre y actividad quelante de hierro donde CP: concentrado proteico, HP: hidrólisis con pepsina, HPP: hidrólisis pepsina pancreatina, HPPA: hidrólisis pepsina pancreatina y alcalasa, (15, 30, 60 y 120 son min).

Los hidrolizados mostraron más del 50% de capacidad quelante de hierro a la concentración de 360  $\mu\text{g/mL}$ . En el caso de la actividad quelante de cobre, los hidrolizados obtenidos con las tres fracciones proteicas mostraron porcentajes superiores al 70% de quelación a 180  $\mu\text{g/mL}$ . Siendo la fracción glutelina la que mostró un mejor perfil progresivo en el aumento de la actividad quelante de cobre. Los hidrolizados proteicos de albúmina mostraron mejor quelante de cobre y de hierro. La hidrólisis con alcalasa durante 15 min, mejoró la actividad quelante de cobre y hierro en el caso de las fracciones albúmina y glutelina, alcanzando su valor máximo a los 30 min, a partir del cual no se aprecia mayor incremento. En el caso de globulina la mejora sólo se evidenció para la capacidad quelante de cobre, mientras que la actividad quelante de hierro no aumentó.

La fracción albúmina hidrolizada con pepsina-pancreatina-alcalasa a los 120 min presentó un 76 % de actividad quelante de cobre y un 60% de actividad quelante de hierro, similares a los resultados reportados por Gallegos-Tintoré y col. (2011) quienes estudiaron la actividad quelante de *Jatropha curcas* de hidrolizados proteicos (200  $\mu\text{g}$  por pocillo) con alcalasa, reportaron 70% de actividad quelante de cobre y 60 % en la actividad de hierro a los 50 y 60 min de

hidrolisis (49). Zhu y col. (2008) reportaron un 49% de actividad quelante de cobre en hidrolizados con pepsina (60 min) y pancreatina (120 min) de Zein a una concentración de 16 mg/mL (93).

La tabla 11 nos muestra los resultados de la actividad quelante de cobre y hierro expresado como la capacidad antioxidante equivalente al EDTA ( $\mu\text{g}$  de EDTA/mg de proteína), siendo la fracción hidrolizada de globulina con  $1.44 \pm 0.25$   $\mu\text{g}$  de EDTA/mg con mayor actividad.

**Tabla 11.** Actividad quelante de cobre y hierro de hidrolizados proteicos de albúmina, globulina y glutelina, con las enzimas pepsina, pancreatina y alcalasa.

		QUELANTE DE COBRE		QUELANTE DE HIERRO	
	Muestras	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\mu\text{g}$ EDTA/mg proteína	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\mu\text{g}$ EDTA/ mg proteína
<b>CP</b>	ALBUMINA	$269.00 \pm 0.93$	$0.06 \pm 0.01$	$591.00 \pm 50.10$	$0.02 \pm 0.00$
	GLOBULINA	$417.00 \pm 4.05$	$0.07 \pm 0.00$	$369.00 \pm 8.45$	$0.01 \pm 0.00$
	GLUTELINA	$887.00 \pm 8.08$	$0.06 \pm 0.00$	$147.00 \pm 12.60$	$0.01 \pm 0.00$
<b>HPPA 120</b>	ALBUMINA	$13.60 \pm 1.17^{a,d}$	$1.40 \pm 0.08^{a,d}$	$18.00 \pm 1.47^{a,d}$	$0.30 \pm 0.02^a$
	GLOBULINA	$10.70 \pm 0.08^{b,d}$	$1.44 \pm 0.25^{b,d}$	$18.40 \pm 1.52^{b,d}$	$0.60 \pm 0.01^{b,d}$
	GLUTELINA	$18.30 \pm 0.64^c$	$0.57 \pm 0.07^c$	$49.20 \pm 3.97^c$	$0.33 \pm 0.01^c$

<sup>a,b,c</sup>  $p < 0.05$  vs CP albúmina, globulina, glutelina, respectivamente; <sup>d</sup>  $p < 0.05$  vs HPPA glutelina, (Test student-Newman-Keuls).

Tanto en la actividad quelante de hierro y de cobre las fracciones hidrolizadas son claramente superiores a los concentrados proteicos de las mismas fracciones, siendo la globulina la que representa mayor actividad quelante de  $\text{Cu}^{+2}$  y presenta menor IC<sub>50</sub> 13.6; 10.07 y 18.30  $\mu\text{g/mL}$  para hidrolizados con albumina, globulina y glutelina respectivamente, observando que la globulina también gran actividad quelante de hierro con un IC<sub>50</sub> de 18.40  $\mu\text{g/mL}$ . Orona y col. (2015) estudiaron la actividad quelante en *Salvia hispánica L.* realizando digestión *In Vitro* con pepsina-pancreatina y reportaron valores de IC<sub>50</sub> de 1.1 mg/mL a fracción de globulina hidrolizada (94).

A partir de los resultados encontrados la hidrólisis secuencial pepsina, pancreatina y alcalasa se propone como una buena estrategia para la obtención de hidrolizados proteicos con buen perfil antioxidante y quelante de metales a partir de las fracciones proteicas de albúmina y globulina de las semillas de *Erythrina edulis*.

## V. CONCLUSIONES

- De las semillas de *Erythrina edulis* (pajuro) se purificaron fracciones proteicas de albúmina, glutelina, globulina y prolamina con porcentajes de rendimiento de 3.93, 3.80, 0.25 y 0.02 % respectivamente. Se destaca el mayor rendimiento de albúmina y glutelina.
- El perfil electroforético, en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, de las fracciones proteicas de *Erythrina edulis* (pajuro) mostraron bandas bien definidas que varían en tamaño e intensidad. Los pesos aproximados fueron de 18, 20, 22 y 40 kDa para la fracción de albúmina; de 22, 38 y 40 kDa para la fracción de globulina; de 18 y 22 kDa para la fracción de prolamina y de 22 kDa para la fracción de glutelina.
- Las fracciones proteicas de albúmina, globulina y glutelina fueron digeridas utilizando un modelo de digestión gastrointestinal, destacando las primeras porque presentaron mejor grado de digestibilidad *In Vitro* con porcentajes de  $77.2 \pm 1.9$  y  $74.7 \pm 2.5\%$ , respectivamente. El grado de hidrólisis con las enzimas pepsina y pancreatina, cuantificado por el método del ortoftaldialdehído, alcanzó valores de  $5.52 \pm 0.6$ ;  $8.48 \pm 0.2$ ;  $20.07 \pm 0.9\%$ , respectivamente; mientras que la hidrólisis secuencial con alcalasa mejoró significativamente el grado de hidrólisis, con porcentajes de  $55.23 \pm 1.8$ ;  $27.36 \pm 0.9$ ;  $47.72 \pm 1.18\%$ , respectivamente.
- Los hidrolizados obtenidos tras la actividad de las tres enzimas sobre la albúmina y globulina fueron los que presentaron una mayor actividad antioxidante, con valores de ORAC-FL de  $4957.2 \pm 35.1$  y  $5177.2 \pm 23.0$   $\mu\text{mol}$  equivalente de Trólox (ET)/mg de proteína, respectivamente y valores de ABTS de  $2866.3 \pm 36.0$  y  $3172.3 \pm 10.9$   $\mu\text{mol}$  ET/g. Además ambos hidrolizados mostraron más del 50% de capacidad quelante de hierro a la concentración de 360  $\mu\text{g/mL}$ . En el caso de la actividad quelante de cobre, los hidrolizados obtenidos con las tres fracciones proteicas mostraron porcentajes superiores al 70% de quelación a 180  $\mu\text{g/mL}$ .

- Las albúminas y globulinas de *Erythrina edulis* (pajuro) presentan un importante potencial como fuente de péptidos antioxidantes y quelante de metales tras la hidrólisis secuencial utilizando un modelo de digestión gastrointestinal y alcalasa *In Vitro*.



## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simpson T, Pase M, Stough C. *Bacopa monnieri* as an antioxidant therapy to reduce oxidative stress in the aging brain. Evid Based Complement Alternat Med [Internet]. 2015;2015:615384. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4564646&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
2. Şanlıdere H, Öner Z. Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. J Dairy Sci [Internet]. 2011;94(11):5305–5314. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030211005571>.
3. Mulero J, Zafrilla P, Martínez-cachá A, Leal M, Abellán J. Péptidos bioactivos. Clínica e Investig en Arterioscler. 2011;23(5):219–227.
4. Chel-Guerrero L, Gallegos-Tintore S, Martinez-Ayala A, Castellanos-Ruelas A, Betancur-Ancona D. Functional properties of proteins from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds. Food Sci Technol Int. 2011;17(2):119–126.
5. Siow HL, Gan CY. Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. Food Chem [Internet]. 2013;141(4):3435–3442. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.030>.
6. Garcia-Mora P, Peñas E, Frias J, Gomez R, Martinez-Villaluenga C. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin i converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. Food Chem [Internet]. 2015;171:224–232. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.116>.
7. Arango O, Bolaños V, Ricaurte D, Caicedo M, Guerrero Y. Obtención de un extracto proteico a partir de harina de chachafruto (*Erythrina edulis*). Univ y Salud. 2012;14(4):161–167.
8. Escamilo S. El Pajuro (*Erythrina edulis*) alimento andino en extinción. Investig Soc UNMSM-IIHS.2012;16(28):97–104.
9. Oseguera M. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de hidrolizados de

- proteína de dos variedades de frijol común. México: Universidad Autónoma de Querétaro; 2009.
10. Borja JE. "Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* ("tarwi") mediante proteasas de *Bacillus sp*". Lima: UNMSM; 2014.
  11. Mojica L, Chen K, Gonzáles de Mejía E. Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin-pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV. J Food Sci. 2014;00(0):H1–11.
  12. Torres-Fuentes C, Contreras MDM, Recio I, Alaiz M, Vioque J. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. Food Chem [Internet]. 2015;180:194–202. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.046>.
  13. Uraipong C. Investigation into the biological functions of rice bran protein hydrolysates. UNSW. 2016.
  14. Orsini Delgado MC, Nardo A, Pavlovic M, Rogniaux H, Añón MC, Tironi VA. Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. Food Chem. 2016;197:1160–1167.
  15. Drummond F, Hernández-Ledesma B, Amigo L, Netto F, Miralles B. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. LWT. Food Science Technology. 2016;1–7.
  16. Bonda DJ, Wang X, Perry G, Nunomura A, Tabaton M, Zhu X, et al. Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention. Neuropharmacology [Internet]. 2010;59(4–5):290–294. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.04.005>.
  17. Poljsak B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. Hindawi Publishing Corporation. Oxid Med Cell Longev. 2011;1-15.
  18. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Angew Chemie Int Ed English.

- 1986;25(12):1058–71.
19. Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins: Physiological consequences. *J Biol Chem*. 1991;266(4):2005–2008.
  20. Soong NW, Hinton DR, Cortopassi G, Arnheim N. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. *Nat Genet* [Internet]. 1992;2(4):318–323. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1303287>.
  21. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. Hindawi Publishing Corporation. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:11.
  22. Martin HL, Teismann P. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J* [Internet]. 2009;23(10):3263–3272. Disponible en: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.08-125443>.
  23. Aksoy H, Dean G, Elian M, Deng HX, Deng G, Juneja T, et al. A4T mutation in the SOD1 gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology*. 2003;22(4):235–238.
  24. Sánchez-Valle V, Valverde M, Carrizales L, Mejía J, Zepeta N, Rojas E. A metal mixture induces transformation upon antioxidant depletion in a hepatic cell line. *Ann Hepatol*. 2013;12(2):315–324.
  25. Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*, [Internet]. 2013;20(3):161–8. Disponible en: <http://www.medicenlinea.com.mx/pdf-revista/RMS133-AR01-PROTEGIDO.pdf>.
  26. De Marchi E, Baldassari F, Bononi A, Wieckowski MR, Pinton P. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2013;2013:564961. Disponible en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23606925](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23606925).
  27. Choi K, Gibbons S, Nguyen T. Gastroparesis. Heme oxygenase-1 protects interstitial cells of cajal from oxidative stress and reverses diabetic

- gastroparesis. In: Gastroenterology. 2008:10–11.
28. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Perspectives in diabetes. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and b-Cell Dysfunction? J Natl Med Assoc. 2003;52(1):1–8.
29. Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. Int Dairy J. 1998;8(5–6):363–373.
30. Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides - Opportunities for designing future foods. Curr Pharm Des [Internet]. 2003;9(16):1297–1308. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=9&issue=16&spage=1297>.
31. Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Structural Analysis of New Antihypertensive Peptides Derived from Cheese Whey Protein by Proteinase K Digestion. J Dairy Sci [Internet]. 1998;81(12):3131–3138. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030298758783>.
32. Kaur M, Singh N. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea ( *Cicer arietinum* L .) cultivars. Food Chem. 2007;102:366–374.
33. Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. Food Res Int. 2004;37(2):123–131.
34. Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, Takenaka Y, Yamamoto T, Yamauchi R, et al. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. Biofactors [Internet]. 2000;12(1–4):143–146. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11216476>.
35. Vermeirssen V, Van Der Bent A, Van Camp J, Van Amerongen A, Verstraete W. A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. Biochimie. 2004;86(3):231–239.
36. Iwaniak A, Minkiewicz P. Proteins as the source of physiologically and

- functionally active peptides. *Technol Aliment*. 2007;6(3):5–15.
37. Vioque J, Mill F. Nuevos agentes promotores de salud. *Agrocsi*. 2005;1–5.
38. Segura Campos M, Che Guerrero L, Betancur Ancona D. Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico. In: *Bioactividad de peptidos derivados de proteínas alimentarias*. OmniaSiencie. 2013:11–27.
39. Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int Dairy J*. 2006;16(11):1315–1323.
40. Dubin A, Mak P, Dubin G, Rzychon M, Stec-Niemczyk J, Wladyka B, et al. New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochim [Internet]*. 2005;52(0001–527X (Print)):633–638. Disponible en: c:%5CKarsten%5CPDFs%5CAntibiotika-PDFs%5CAnti-2005%5CDubin et al.-New generation of peptide antibiotics.pdf.
41. Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Protein Struct Mol*. 1992;1121(1–2):130–136.
42. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Curr Pharm Des*. 2004;10:1677–1694.
43. Youngdon R. Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes. Rio de Janeiro: Campus; 1995:168.
44. Ruiz Roca B. *Propiedades Antioxidantes De Los Productos*. Universidad de Granada; 2009.
45. Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverrí J. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev Investig Clin*. 2006;58(4):350–358.
46. Preza y Lerma AM. "Obtención de péptidos mediante hidrólisis enzimática de proteínas de reserva en la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.)". México; Instituto Politécnico Nacional. 2010.
47. Dorado-Martínez C, Rugerio-Vargas C, Rivas-Arancibia S. Estrés oxidativo y

- neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM. 2003;46(6):229–235.
48. De Mejía EI, De Lumen BO. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. Sex Repro Menopause. 2006;4(2):91–95.
  49. Gallegos-Tintor S, Torres-Fuentes C, Martínez-Ayala AL, Solorza-Feria J, Alaiz M, Girón-Calle J, et al. Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L . protein hydrolysates Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L . protein hydrolysates. Sci Food Agric. 2011;91:1618–1624.
  50. Ryan TP, Aust SD. The Role of Iron in Oxygen-Mediated Toxicities. Crit Rev Toxicol. 1992;22(1):119–141.
  51. Bisby RH, Brooke R, Navaratnam S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. Food Chem. 2008;108(3):1002–1007.
  52. Debnath T, Park PJ, Deb Nath NC, Samad NB, Park HW, Lim BO. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts. Food Chem [Internet]. 2011;128(3):697–703. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.090>.
  53. Prior RWXSK. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53:4290–4302.
  54. López Tévez LL. Estudios de coplejos metálicos con ligandos de interés biológico. Universidad Nacional de la Plata; 2016.
  55. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). Anal Biochem. 1971;40(2):450–458.
  56. Stookey LL. 1970\_Ferrozine A new Spectrophotometric Reagent for Iron. Anal Chem. 1970;42(7):779–781.
  57. Wang W, Gonzalez De Mejia E. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2005;4:63–78.

58. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J.* 2006;16(9):945–960.
59. Adamson NJ, Reynolds EC. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. *Enzyme Microb Technol.* 1996;19(3):202–207.
60. Cruz E. Obtención de péptidos alimentarios mediante hidrólisis enzimática con efectos sobre la salud intestinal [Internet]. 2016. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/38742/>.
61. Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* 2008;42(2):227–237.
62. Russo RO. Erythrina: un género versátil en sistemas agroforestales: revisión bibliográfica. Turrialba, Costa Rica Cent Agronómico Trop Investig y enseñanza CATIE Programa Recur Renov. 1984:14–69.
63. Araujo Abanto VA. Estudio taxonomico e histológico de seis especies del género *Erythrina* L. (FABACEAE). UNMSM. 2005.
64. Shady R. Sustento socioeconómico del Estado prístino de Supe-Perú: las evidencias de Caral-Supe. *La Ciudad Sagrada de Caral-Supe: Los orígenes de la civilización andina y la formación del Estado prístino en el antiguo Perú: Los orígenes de la civilización andina y la formación del Estado prístino en el antiguo Perú.* Instituto Nacional de Cultura. 2003:346.
65. Antunez de Mayolo S. La nutrición en el antiguo Perú. 1981.
66. Acero Duarte LE. Guía para el cultivo y aprovechamiento del Chachafruto o Balú (*Erythrina edulis*) Triana ex Micheli. [Internet]. 2002:1-45. Disponible en: <http://babel.banrepcultural.org/cdm/ref/collection/p17054coll10/id/1300>.
67. M T ex. *Erythrina edulis*, poroto chachafruto. *Agrofor Database.* 2009;4(0):1–5.
68. Brako L, Zarucchi J. Catalogue of the Flowering Plant and Gymnosperms of Peru. *Monogr Sist Bptany from Missouri Bot Gard.* 1993;45:0161–1542.
69. Osborne T. The proteins of the wheat kernel. *Journal of Chemical Information*

- and Modeling. 1907; 53(9):1689-1699.
70. Chavan UD, McKenzie DB, Shahidi F. Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chem.* 2001;74(2):177–187.
71. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–254.
72. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for the color formation. *Anal Biochem.* 1988;175:231–237.
73. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Provenzano MD, Fujimoto EK, et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid<sup>®</sup>. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.
74. García Pérez HM. Electroforesis en geles de poliacrilamida : fundamentos , actualidad e importancia. *Univ Diag.* 2000;1(2):31–41.
75. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* [Internet]. 1970:680–685. Disponible en: <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-change-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certain-antibiotics/>.
76. Vilela RM, Lands LC, Chan HM, Azadi B, Kubow S. High hydrostatic pressure enhances whey protein digestibility to generate whey peptides that improve glutathione status in CFTR-deficient lung epithelial cells. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50(11):1013–1029.
77. Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Protein hydrolysates : processes and applications. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2008;42(2):227–237.
78. Nielsen PM, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of food science.* 2001;66(5):642–646.
79. Alberto B, Zapata K, Cortes FB. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2012;17(4):408–419.



80. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. *Food Chem.* 2004;52:48–54.
81. Re R, Pellergrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. *Free Radical Biology & Medicine.* 1999;26(98):1231–7.
82. Megíaas C, Pedroche J, Yust M, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, et al. Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Agric ang food Chem.* 2007;55:3949–3954.
83. Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant Activity of Peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease yreatment. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:3661–3667.
84. Pérez G, Martinez C, Díaz E. Evaluacion de la calidad de la proteina de la *Erythrina edulis* (BALU). *Arch Latinoam Nutr.* 1979;29(2):193–207.
85. D'Amore C. Evaluación nutricional de harina de *Erythrina edulis*. Universidad Central de Venezuela. 2016.
86. Samanta TD, Laskar S. Chemical investigation of *Erythrina variegata linn.* seed proteins. *Food Chem* [Internet]. 2009;114(1):212–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j. Food Chem. 2008.09.040>.
87. Roberts PR, Burney JD, Black KW, Zaloga GP. Original Paper : Small bowel effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal Tract. *S Karger AG, Basel.* 1999;60:332–337.
88. Intuilla A, Jiménez K, Zavaleta A, Arnao I, Peña C, Chávez E, et al. *Erythrina edulis* (Pajuro) Seed Protein: A New Source of Antioxidant Peptides. *Nat Prod Comun.* 2016;11:1–6.
89. Intiquilla A. Evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos obtenidos a partir de semillas de *Erythrina edulis*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
90. Durak A, Baraniak B, Jakubczyk A, ´Swieca M. Biologically active peptides

- obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. Food Chem. 2013;141:2177–2183.
91. Alashi AM, Blanchard CL, Mailer RJ, Agboola SO, Mawson AJ, He R, et al. Antioxidant properties of *Australian canola* meal protein hydrolysates. Food Chem [Internet]. 2014;146:500–506. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.081>.
  92. Ramos MLG, Gordon AJ, Minchin FR, Sprent JI, Parsons R. Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Ann Bot (Lond). 1999; 83, 57–63.
  93. Zhu L, Chen J, Tang X, Xiong Y. Reducing , radical scavenging , and chelation properties of *In Vitro* digests of alcalase-treated Zein hydrolysate. J. Agric. Food Chem. 2008;56:2714–2721.
  94. Orona-tamayo D, Valverde ME, Nieto-rend B, Paredes-López O. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. Food Sci Technol. 2015;64:236–242.